



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y FARMACOLÓGICO DE  
RETAMA MONOSPERMA BOISSIER**

Tesis Doctoral presentada por

**NURIA HAIDEE GONZÁLEZ MAURAZA**

Para optar al Grado de Doctora en Farmacia

Sevilla, 2015





Dña. Carmen Martín Cordero, Titular de Universidad y Dña. Marina Sánchez Hidalgo, Profesora Contratada Doctora adscritas al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

**INFORMAN:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Estudio fitoquímico y farmacológico de retama monosperma boissier”** ha sido realizada por Nuria Haidee González Mauraza bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarle.

Y para que conste, firman el presente, en Sevilla, a 13 de Octubre de 2015

Fdo.: Carmen Martín Cordero

Fdo.: Marina Sánchez Hidalgo





Dña. María Dolores García Giménez, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

**INFORMA:**

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Estudio fitoquímico y farmacológico de retama monosperma boissier”** ha sido realizada por Nuria Haidee González Mauraza bajo la dirección de las profesoras Dña. Carmen Martín Cordero, Titular de Universidad y Dña. Marina Sánchez Hidalgo, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firman el presente, en Sevilla, a 13 de Octubre de 2015

Fdo.: María Dolores García Giménez



## **ABREVIATURAS**

---





## A

---

**5-ASA** : ácido 5-aminosalicílico  
**AINE** : antiinflamatorios no esteroideos  
**AST** : aspartato aminotransferasa  
**AO**: aceite de oliva  
**AOVE**: aceite de oliva virgen extra

## C

---

**CARD9** : aspartate recruitment domain-containing protein 9  
**CCF**: Cromatografía en capa fina  
**COX**: ciclooxigenasa  
**COLS**: colaboradores  
**CU**: Colitis Ulcerosa

## D

---

**DSS**: dextrano sulfato sódico

## E

---

**EII**: Enfermedad Inflamatoria Intestinal  
**EC**: Enfermedad de Chron  
**ELAM-1**: endothelium leukocyte adhesion molecule 1  
**EsA**: Agentes estimulantes de eritropoyetina  
**Et al**: y otros

## F

---

**FI**: insaponificable  
**FOXP3**: forkhead box P3

## G

---

**g**: gramos  
**GM-CSF**: colonias de granulocitos-macrófagos

## H

---

**HLA** : antígeno leucocitario humano

## I

---

**IBD**: Inflammatory bowel disease  
**IC**: intervalo de confianza  
**ICAM-1**: Intercellular Adhesion Molecule 1  
**IFN- $\gamma$** : interferón gamma  
**Ig**: inmunoglobulinas  
**IgG1**: inmunoglobulina G1  
**IL** : interleucina  
**iNOS** : óxido nítrico sintasa inducible  
**IPAA** : anastomosis del pouch ileo anal  
**I.V.:** intravenosa

<b>J</b>	
	<b>JC</b> : John Cunningham
<b>K</b>	
	<b>Kg</b> : kilogramos
<b>L</b>	
	<b>LMP</b> : leucoencefalopatía multifocal progresiva
<b>M</b>	
	<b>6-MP</b> : 6-mercaptopurina <b>mg</b> : miligramos <b>MHC</b> : complejo mayor de histocompatibilidad <b>MMP</b> : Matrix metaloproteínase
<b>N</b>	
	<b>NOD2</b> : nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 <b>NF-kappaB</b> : Factor de transcripción nuclear <b>NK</b> : natural killer <b>NW</b> : Noroeste
<b>P</b>	
	<b>PCR</b> : proteína C reactiva <b>P. ej</b> : por ejemplo <b>PG</b> : prostaglandinas <b>PPAR-γ</b> : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<b>R</b>	
	<b>RR</b> : riesgo relativo
<b>S</b>	
	<b>SW</b> : Suroeste
<b>T</b>	
	<b>TGF-β1</b> : Factor de crecimiento transformante beta 1 <b>TNF</b> : Factor de necrosis tumoral <b>TNBS</b> : Trinitrobenceno sulfónico <b>Treg</b> : Células T reguladoras <b>TLR</b> : Receptores tipo toll <b>TPMT</b> : tiopurín-metil-transferasa
<b>V</b>	
	<b>VCAM-1</b> : Vascular cell adhesion molecule 1

# **INDICE**

---



## **INTRODUCCION**

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **BLOQUE I: ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE R. MONOSPERMA BOISSIER**

#### **CAPITULO I.** *Isolation, identification and quantification of D-pinitol in the Genus Retama.....*

### **BLOQUE II: EFECTOS DE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS EN LA INFLAMACIÓN AGUDA**

#### **CAPITULO II.** *R. Monosperma (L.) Boiss extract inhibits LPS-induced pro-inflammatory mediators in murine macrophages via suppression of NFκB activation.....*

#### **CAPÍTULO III.** *D-Pinitol inhibits LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages blocking NF-κB signalling pathway.....*

### **BLOQUE III. ACTIVIDAD DE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

#### **CAPITULO IV.** *Anti-inflammatory effects of Retama monosperma in acute ulcerative colitis in rats.....*

## **RESULTADOS GLOBALES /DISCUSION**

## **CONCLUSIONES**

## **BIBLIOGRAFIA**



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---





La alta diversidad de especies vegetales con importantes propiedades terapéuticas, ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda y obtención de drogas alternativas que presenten efectos colaterales en menor medida respecto a las convencionales y, de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan sus propias plantas.

Entre la gran variedad de especies vegetales de interés terapéutico, se encuentran las plantas del género *Retama* (Fabaceae), de las que su uso medicinal ha sido respaldado por estudios científicos realizados en varios modelos experimentales, mediante los cuales se han comprobado algunos efectos biológicos y farmacológicos ya descritos en la literatura. Diferentes estudios han dado a conocer las distintas propiedades que presentan los miembros pertenecientes a este género, como sus acciones hipoglucemiantes y antimicrobianas, antiulcerosas, antihiperlipidémicas, antioxidantes y antiinflamatorias. No obstante, no existen hasta la fecha, estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* que validen el potencial de *Retama monosperma* o de sus componentes bioactivos en la terapéutica de la EII, así como los mecanismos de acción y vías de señalización intracelulares implicados.

Por ello el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *Retama monosperma* Boissier. En concreto, nos hemos centrado en los siguientes objetivos:

1. Aislamiento, purificación y caracterización de principios activos presentes en *Retama monosperma*
2. Estudiar el potencial antiinflamatorio e inmunomodulador de *Retama monosperma* y sus compuestos bioactivos en la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos peritoneales de ratón. Explorar los mecanismos de acción y vías de señalización intracelulares posiblemente implicados.
3. Valorar los efectos de la administración de un extracto acuoso estandarizado de *Retama monosperma* en un modelo de colitis aguda experimental inducida por TNBS en ratas. Valoración histológica y estudio de las rutas bioquímicas y vías de señalización intracelulares posiblemente comprometidas.



# INTRODUCCIÓN

---



## I.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **I.1. Retama Monosperma Boisser**

Retama monosperma (L.) Boiss.

#### **Sinónimos**

- Spartium monospermum L., Sp. Pl.: 708 (1753) [basién.]
- Lygos monosperma (L.) Heywood in Feddes Repert. 79: 53 (1968)

#### **I.1.1 Situación taxonómica**

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliophytina

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Genisteae

Género: Retama

Especie: Retama monosperma Boissier

La división Spermatophyta, en la subdivisión Magnoliophytina (antes llamada Angiospermae) comprende la clase Magnoliopsida, conocida como Dicotyledoneae. Esta clase comprende a su vez la subclase Rosidae, uno de cuyos diecisiete órdenes es el Orden Fabales.

En nuestro caso, utilizaremos el término Fabáceas incluyendo a tres subfamilias, de las cuales, la subfamilia típica Papilionoideae (nombre descriptivo de aceptable alternativa) abarca diez tribus.

La tribu Genisteae se caracteriza por incluir arbustos, matas o más raramente hierbas que presentan hojas con 3-5 foliolas, digitadas, rara vez unifoliadas o afilas y con filodios espinosos. El cáliz es por lo general bilabiado, rara vez espatáceo. Androceo monoadelfo. Ovario con dos a numerosos primordios seminales y legumbres lineares oblongas u ovadas.

A su vez, el género Retama se caracteriza por incluir especies que vegetativamente son arbustos inermes de hojas simples, caducas, de flores pequeñas, en racimos auxiliares, cáliz campanulado, bilabiado, persistente o caducos, androceo monoadelfo, legumbres indehiscentes, con 1-2 semillas, y que en el área circunmediterránea está representada por cuatro especies:

Retama sphaerocarpa Boissier,

Retama dasycarpa Cosson,

Retama raetam (Forsskal) Webb,

Retama monosperma (L.) Boissier.

### **I.1.2.Descripción botánica**

*Retama monosperma* Boissier es un arbusto o árbol pequeño de (1,5)2-3 m. Ramas redondeadas, con (11)13(14) costillas longitudinales en forma de T, seríceo-plateadas cuando jóvenes, más tarde glabrescentes (Fig. 1); indumento doble, con pelos rectos y adpresos en las costillas, y con pelos cortos y acaracolados en los valles intercostales. Hojas con folíolos 4-8 x 0,7-1 mm, lanceolados, oblanceolados o linear-lanceolados, seríceoplateados por ambas caras, muy fugaces. Inflorescencias axilares en racimos solitarios o geminados, con 10-26 flores; bráctea y bractéolas de 1,5-2 x 0,7-1,7 mm, lanceoladas u ovado-elípticas, seríceas, muy fugaces; pedicelo c. 1 mm, seríceo (Fig. 2). Cáliz 3-4 mm, campanulado-cilíndrico,  $\pm$  bilabiado, rojizo, glabrescente, con los lóbulos del labio superior muy próximos a los del labio inferior; tubo 2-2,5 mm; labio superior con lóbulos c. 1,5 x 1,5 mm; labio inferior con dientes de 0,3-0,5 mm.



**Figura 1.**



**Figura 2.**



**Figura 3.**

Corola blanca; estandarte 9-10,5 x 7-9 mm, elíptico, apiculado, atenuado en la base, seríceo en el dorso, con uña de c. 1,5 mm, poco diferenciada; alas 9-11 x 2,3-3 mm, del tamaño del estandarte, lanceolado-elípticas, con el dorso seríceo en la mitad superior, las aurículas ciliadas y uña de c. 2 mm; quilla 7-8,5 x 1,7-2,5 mm, mucho más corta que el estandarte y que las alas, con el ápice linear-lanceolado, seríceo en la mitad superior, con el margen inferior y la aurícula ciliados, y uña de c. 2 mm. Androceo con 4 estambres cortos con anteras basifijas, 5 medianos con anteras dorsifijas y 1 largo con antera basifija; anteras basifijas 0,6-0,8 mm, ovoideas, las dorsifijas 0,3-0,4 mm, subglobosas. Ovario glabro –salvo por lo que se refiere a los pelos acaracolados de la línea interna de sutura–, con 4-7 rudimentos seminales.

Fruto de 10-22 x 9-14 mm,  $\pm$  globoso, a veces algo arqueado, apiculado, glabro externamente, algodonoso internamente, reticulado, con una quilla muy desarrollada en la línea de sutura, con pericarpo carnoso y

azucarado en la madurez, caduco, dehiscente, monospermo –rara vez con 2-3 semillas–. Semillas 4-6 x 5,2-8,5 mm.  $2n = 48$ ,  $n = 24$  (Fig. 3).

### **I.1.3 Distribución geográfica**

*Retama monosperma* L. (Boiss.) O *Genista monosperma* L. (Lam.), es una planta anual y espontánea perteneciente a la familia Fabaceae. Vive fundamentalmente en zonas costeras sobre suelos arenosos, ya que son resistentes a ambientes salinos y además es buena para la retención de dunas móviles. Normalmente, florece y fructifica normalmente de Enero a Abril. Se localiza en Arenales marítimos y bordes de la marisma. Litoral, Marisma, Algeciras. Distribución general. SW de la Península Iberica (Provincia Gaditano-Onubo-Algarviense), NW de África.

### **I.1.4. Etnofarmacología**

Esta planta se utiliza en la medicina tradicional en muchos países, como purgante, vermífugo, antihelmíntico, y abortivo. Varios estudios han puesto de manifiesto la actividad hipoglucemiante diurética (Algandaby MM, 2010), citotóxica (Edziri H, 2012), antioxidante, antiviral [Belmokhtar Z, 2014] antibacterial, antifúngica (Edziri H, 2012), antihipertensiva [Eddouks M, 2007], anti-inflamatoria (Bremner P, 2009) y antitumoral (López-Lázaro M, 1999) del género *Retama*.

### **I.1.5. Composición química**

En esta especie se han identificado por cromatografía en capa fina (CCF) los siguientes flavonoides: daidzeína, genisteína, 5-metilgenisteína (Harborne, 1971). Asimismo, los alcaloides identificados son del tipo quinolizidínico: esparteína (10.97%), citisina L-metilo (9.11%), 17-oxosparteina (3.49%), lupanina (0.93%) y anagrina (39.63%). (Merghoub N, 2012)

Las semillas contienen citisina, un alcaloide tóxico. De forma similar, se han podido aislar de diferentes partes de la planta, unos quince alcaloides quinolizidínicos y tres dipiperidina. En particular, la presencia de (+) - esparteína,  $\alpha$ -y  $\beta$ - isosparteina, (+) -17 - oxosparteina, (-) - lupanina, 5,6-dehydrolupanine, (-) - anagrina, (-) - N -metilcitisina y (+) - ammodendrina pueden ser detectadas (Touati D, 1996).

Además, en esta especie ha sido identificado el ácido  $\alpha$ -linolénico, y fitoesteres tales como, el campesterol, estigmasterol y sitosterol (Belayachi L, 2014)

### **I.1.6. Actividad farmacológica**

#### **I.1.6.1. Actividad antioxidante**

La relación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico (polifenoles totales, flavonoides y taninos condensados) de *Retama monosperma* (Fabaceae), comúnmente utilizada en la medicina tradicional de las regiones mediterráneas, se ha investigado y los resultados obtenidos en diversos estudios llevados a cabo con la fracción de acetato de etilo han revelado que las semillas son una potencial fuente de antioxidante natural para *R. monosperma* (Belmokhtar Z: 2014).

#### **I.1.6.2. Actividad antitumoral**

Recientemente, ha sido descrita la actividad antiproliferativa de un extracto de hexano de *Retama monosperma* en células leucémicas, sugiriéndose que los compuestos bioactivos presentes en dicho extracto, muestran una potente actividad antitumoral al inducir en estas células cancerígenas la detención del ciclo celular y la muerte celular programada al menos parcialmente, a través de la vía de la apoptosis extrínseca (Belayachi L, 2014)

Resultados similares han sido descritos en las líneas celulares humanas de cáncer cervical SiHa y HeLa, donde se ha puesto de manifiesto el efecto antiproliferativo de diferentes extractos obtenidos de *Retama monosperma* L. Concretamente, este estudio demostró cómo el extracto de diclorometano de *R. monosperma* L. exhibe una potente actividad anticancerígena *in vitro* frente a líneas celulares de cáncer de cuello uterino a través de la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis mediada por la vía intrínseca (Merghoub N, 2011)

#### **I.1.6.3. Actividad antiinflamatoria**

La identificación de plantas con actividad antiinflamatoria puede basarse en el éxito de información sobre los conocimientos tradicionales a través de su uso. En este sentido, en un estudio llevado a cabo en células HeLa, el género *Retama* ha demostrado ejercer un efecto inhibitorio sobre la producción de los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF) a través de la vía de señalización del factor de transcripción nuclear (NF-kappaB) (Bremer.P, 20019 )



## **II. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

### **II.1. CONCEPTO**

Bajo la denominación común de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se incluyen un conjunto de enfermedades que afecta al tubo digestivo provocando procesos inflamatorios en alguna de sus partes (desde la boca hasta el ano) de forma crónica. Entre estas enfermedades se encuentran la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Chron (EC), de etiología desconocida y de evolución crónica, caracterizada por períodos de remisiones y de exacerbaciones. Ambas afectaciones inflamatorias comparten aspectos epidemiológicos y presentan síntomas clínicos, signos radiológicos y hallazgos anatomopatológicos comunes. Sin embargo, se diferencian principalmente en su localización, forma de afectar el espesor de la pared intestinal, y en las diferentes complicaciones locales y en sus respuestas a la cirugía. Las manifestaciones extraintestinales que pueden presentar estas patologías con frecuencia siguen un curso recidivante (Szigethy y cols., 2010). Cuando no resulta posible diferenciar ambas entidades, se diagnostica como “colitis indeterminada” (Burakoff, 2004).

La CU afecta difusa y superficialmente a la pared intestinal, principalmente al recto y al colon distal, y se caracteriza por una inflamación crónica de la mucosa colónica que cursa de manera remitente y recidivante, con síntomas intermitentes de sangrado rectal y diarrea, provoca unas pequeñas úlceras (heridas abiertas) que son las causantes del dolor asociado a esta patología. La CU colitis ulcerosa puede afectar a una parte de intestino grueso más o menos extensa (proctitis, proctosigmoiditis, colitis izquierda, colitis extensa), o bien a todo el colon (pancolitis). En esta enfermedad, la inflamación crónica puede conducir a displasia y cáncer colorrectal (Principi M., 2014)

La EC es un proceso inflamatorio transmural que cursa con inflamación crónica recidivante pero, a diferencia de la CU, puede afectar a todo el tubo digestivo (desde la boca al ano). generalmente Generalmente, las zonas más afectadas son el final del intestino delgado (íleon) y el principio del intestino grueso (ciego), aunque también puede verse afectado el intestino grueso (colitis) y el delgado (enteritis), de forma segmentaria y discontinua, es decir, encontrándose segmentos de intestino normal entre la zona lesionada (Szigethy y cols., 2010).

### **II.2. EPIDEMIOLOGÍA**

Se ha sugerido un origen inmuno-genético, pero con importante aportación en su etiopatogenia de factores ambientales continúan siendo motivo de controversia. Comienza principalmente en la adolescencia y

primeras etapas de la vida adulta (Keighley 2003; Lashner, 1992), con lo que no es de extrañar el gran impacto que producen estas enfermedades tanto en el paciente, como en la sociedad y sistema sanitario.

La incidencia en España parece haberse incrementado en los últimos años, variando de unas regiones a otras. La incidencia de CU en nuestro país oscila entre 0,6 y 8 casos/100.000 habitantes/año, con una media de 3,8. Las cifras correspondientes para la EC enfermedad de Crohn varían entre 0,4 y 5,5 casos/100.000/año, con un valor medio de 1,9 (Pajares JM, 2001). La prevalencia de la EII en España, aunque es muy difícil de establecer, se estima alrededor de 87-110 casos/100.000 habitantes/año (Sicilia B, 2009).

La edad de inicio de esta patología se reparte principalmente entre los 15 y los 30 años y entre los 50 y los 70, presentando una mayor prevalencia en las poblaciones de Europa y América del Norte, mientras que el menor número de casos se da en Asia Continental, alcanzándose mayor número de casos en las islas nórdicas de Faroe (Burisch y cols., 2013)

Por otro lado, entre un 25%-36% de los pacientes de EII presentarán alguna manifestación extraintestinal a lo largo de su evolución. De ellas, las complicaciones musculoesqueléticas son las más frecuentes, fundamentalmente en forma de artritis periférica y axial, existiendo otras como la osteopatía hipertrófica, entesitis, lesiones articulares granulomatosas y periostitis.

Debemos señalar que en pacientes con Agentes estimulantes de eritropoyetina (EsA), se ha demostrado la existencia de inflamación intestinal macro o microscópica en un 20-70% de los mismos. Existen dos tipos de afectación intestinal: una aguda, con lesiones que asemejan una enterocolitis infecciosa, y otra crónica, con agregados linfoides o distorsión de las criptas. Esta última puede evolucionar a una EII, sobretudo a EC. Parece que la permeabilidad intestinal aumentada juega un papel preponderante estando incrementada en pacientes con EsA y en enfermos de Crohn. La afectación articular sucedería como consecuencia de la migración de linfocitos T desde el intestino a la membrana sinovial, iniciando una respuesta inmune anómala. Asimismo, en la EII y en los EsA, la inmunidad innata alterada puede contribuir a un control deficiente sobre la propia flora o los patógenos intestinales.

### **I.3. ETIOPATOGENIA**

Si bien, las causas fisiopatológicas de la EII permanecen sin conocerse y, en consecuencia, seguimos sin disponer de un tratamiento curativo, los últimos años han aportado importantes avances en el conocimiento de sus mecanismos patogénicos. En este sentido, se considera que estas enfermedades son la consecuencia

de una compleja interacción entre factores genéticos, medioambientales, microbiológicos e inmunes (Neuman y Nanau, 2012).

La etiología de las EII es desconocida; si bien diversos estudios han sugerido que el desarrollo de la EC y de la CU es el resultado de la interacción de factores genéticos con factores ambientales actuando sobre el sistema inmunomodulador presente en la mucosa gastrointestinal, provocando un ciclo continuo de inflamación. La mucosa intestinal es una barrera funcional entre el medio interno y las bacterias localizadas en el lumen intestinal. La presencia constante de antígenos bacterianos mantiene al sistema inmune de la mucosa en un estado de inflamación controlada. La injuria de la mucosa se debe a un quiebre de la inmunoregulación a este nivel por una respuesta inmunológica excesiva a los antígenos bacterianos o un déficit en la respuesta inmunológica después de una infección por un patógeno. El balance inflamatorio de la mucosa depende de la población de citocinas, la cual es variable y está influenciada por factores genéticos y ambientales, incluyendo la composición de la flora bacteriana luminal. En la CU aunque no existe un patrón de citocinas predominante, parece existir una tendencia hacia un patrón Th2. Por el contrario, en la EC existe un patrón excesivo de e tipo Th1 proinflamatorio. Estudios recientes han demostrado que una nueva clase de linfocitos T adyuvantes llamados Th17 se encuentran elevados en modelos experimentales de CU colitis y en pacientes con EC. Además de las alteraciones en el patrón de citocinas, también se ha demostrado la presencia de alteraciones en el patrón inmune humoral (Beltrán y col., 2005) y en las células dendríticas en pacientes con EII (Silva et al., 2007).

### **I.3.1. Factores ambientales**

Las EII se encuentran distribuidas por todo el mundo con un claro predominio en los países industrializados, principalmente en el Norte de Europa y en Norteamérica con un claro gradiente de norte a sur y de este a oeste. En los últimos cincuenta años se ha observado que la incidencia de la CU viene en disminución y la de EC en aumento (Quero Acosta y cols., 2003). La distribución geográfica así como diversos datos epidemiológicos, sugieren la presencia de factores ambientales; aunque también parece ser que contribuyen otros diversos, tales como, factores genéticos, tabaco, el estrés, factores higiénicos en la niñez, fármacos y dieta (Peña, 1998; Szigethy y cols., 2010). De todos ellos, el tabaco es el ejemplo más destacable de la influencia de los factores ambientales en la EII. Sorprendentemente, el tabaco tiene un efecto completamente opuesto en la EC y la CU; confiriendo un factor protector en pacientes con CU, pudiendo llegar a desencadenar una crisis con la suspensión del mismo, mientras que puede aumentar el riesgo de desarrollar EC, así como la severidad e incidencia de recaídas posterior a cirugía (Miadd y col., 2006). Por

tanto, se piensa que dejar de fumar mejora el curso de la enfermedad mientras que su abandono incrementa el riesgo de desarrollar CU, sugiriendo un papel protector en esta forma de EII (Vvan der Heide y cols., 2009). No obstante, se desconocen los mecanismos por los cuales el cigarrillo afecta la evolución de las EII.

### **I.3.2. Factores microbiológicos.**

Entre los factores microbiológicos, podemos decir que existen numerosas evidencias de que la flora entérica juega un papel clave en el desarrollo de la EII. Así, algunos estudios han mostrado que existe un elevado número de bacterias en contacto con la mucosa de pacientes con EII, así como también que las lesiones en esta enfermedad ocurren preferentemente en los segmentos donde la concentración de bacterias es mayor y finalmente, que la modulación de la flora entérica con antibióticos y probióticos atenúa la inflamación. En este sentido, se ha propuesto que en los pacientes con EII existe una pérdida de tolerancia inmune de la mucosa contra la flora normal del intestino, ocasionando una respuesta inmune anormal, la cual se manifiesta en el proceso inflamatorio crónico típico de la EII (Elson y cols., 2005).

### **I.3.3. Factores genéticos.**

Los estudios genéticos demuestran la presencia de una predisposición hereditaria necesaria para el desarrollo de la enfermedad, constatándose que entre un 15-25 % de los pacientes con EII se encuentra una historia familiar positiva. Sin embargo, aún no se conoce bien cómo se produce esta interacción. La EC y la CU son enfermedades complejas, poligénicas, de penetrancia variable. Se estima que el riesgo de padecer EII cuando un padre está afectado de EC es del 9.,2% y del 6.,2% cuando lo está de CU. Cuando ambos padres tienen EII el riesgo aumenta al 30%.

La concordancia en gemelos monocigóticos para la EC es del 37.,3% y del 10% para CU (para dicigóticos del 7% y 3%, respectivamente). Se han descubierto regiones de susceptibilidad en distintos cromosomas, loci IBD que afectan sobre todo a la inmunidad innata, moléculas del sistema antígeno leucocitario humano (HLA), permeabilidad intestinal (integridad epitelial, adhesión celular), procesamiento intracelular de bacterias o respuesta inflamatoria.

Los polimorfismos encontrados en la EII, se presentan primordialmente en genes implicados en la regulación de la función de la barrera epitelial, mecanismos de reparación del epitelio, defensa microbiana, regulación de la inmunidad innata y adaptativa, autofagia, apoptosis y otras vías relativas a las homeostasis celular (Khor y cols., 2011).

El primero descubierto fue el gen **NOD2** en el cromosoma 16 ligado a la EC, cuyo producto es una proteína de reconocimiento de péptidos bacteriano. La flora bacteriana endógena juega un papel primordial en la patogenia y los esfuerzos se centran en conocer su interacción con una respuesta inmune normal o disregulada. (Lesage y cols., 2002; Abraham y Cho, 2006; . Lin y cols., 2013).

En relación a **CARD 9**, su función es la de integrar señales procedentes de la inmunidad adaptativa en respuesta a bacterias y virus y hongos (Hsu y cols., 2007; Levine y Deretic, 2007; Cooke y cols., 2012).

En cuanto a **ATLGL16L1 e IGRM**, ambos genes están implicados en la regulación de la autofagia, mecanismo celular que permite la degradación de componentes intracelulares, incluyendo patógenos, cuerpos apoptóticos y organelas (Hampe y cols., 2007; Parkes y cols., 2007; ., Rioux y cols., 2007; , Lin y cols., 2013).

El polimorfismo en el gen de la **IL10** que codifica la citocina anti-inflamatoria IL-10, se relaciona con CU infantil. Su mutación bloquea la vía del factor transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3) impidiendo su fosforilación (Franke y cols., 2008; Glocker y cols., 2009; Louis y cols., 2009; Thompson y Lees, 2011).

La región **HLA** contiene genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Su polimorfismo se ha relacionado con CU extensas, de mal pronóstico y que presentan numerosas manifestaciones extraintestinales, así como con manifestaciones de la EC con afectación únicamente colónica (Silvverberg y cols., 2003, liu y cols., 2013).

Finalmente, el polimorfismo en el gen **IL-23** se ha representado tanto en pacientes de EC como de CU, se encuentra directamente relacionado con la activación de los linfocitos Th17 efectoras y por tanto tiene un papel clave en la respuesta inmunitaria adquirida (Brand y cols.,2009; Van Limbergen y cols., 2013).

#### **I.3.4. Factores inmunológicos**

Se han realizado estudios inmunológicos de la mucosa de pacientes con EC y CU en los que se consideran que las células T (células del sistema inmune adaptativo) son los mediadores de la inflamación intestinal, aunque también hay estudios recientes que muestran el papel de la inmunidad innata, sugiriendo que la respuesta mediada por células T en la mucosa podría ser secundaria a los defectos en la respuesta inmune innata.

Se ha demostrado que en la EII la permeabilidad de la barrera intestinal está alterada, ya que existen anomalías de las uniones intercelulares y hay evidencias de una disminución de la producción de moco lo

que permite el paso libre de antígenos hacia la lámina propia (Motilva y cols., 2008). Además, en pacientes con EC se ha encontrado un bajo contenido en  $\alpha$ -defensinas en el íleon afectado, teniendo por tanto disminuida la actividad antimicrobiana en la mucosa intestinal, lo cual puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Wehkamp y cols., 2005).

Por otra parte, las acciones llevadas a cabo por las células epiteliales e inmunes para mantener la homeostasis intestinal son mediadas principalmente por los receptores tipo toll (TLR), localizados en la superficie celular y por las proteínas con dominio de unión a nucleótidos-oligomerización 2 (NOD2). Existen evidencias de que el comportamiento de las células que median la inmunidad innata y la expresión y función de TLR y NOD2 se encuentran alteradas en la EII, contribuyendo así a la patogénesis de dicha enfermedad. Así, durante esta enfermedad, la señalización aberrante de TLR y/o NOD2 puede estimular diversas respuestas inflamatorias conduciendo a una inflamación intestinal aguda y crónica (Zhang y cols., 2006). Varios autores han descrito que la expresión de TLR2 y TLR4 están disminuida en la mucosa colónica de personas sanas y por el contrario se encuentra incrementada en pacientes con EC y CU (Cario y cols., 2000, Szebeni y cols., 2008). Sin embargo, se ha detectado una disminución en la expresión de TLR3 en EC activa, pero no en enfermos con CU (Cairo y cols., 2000).

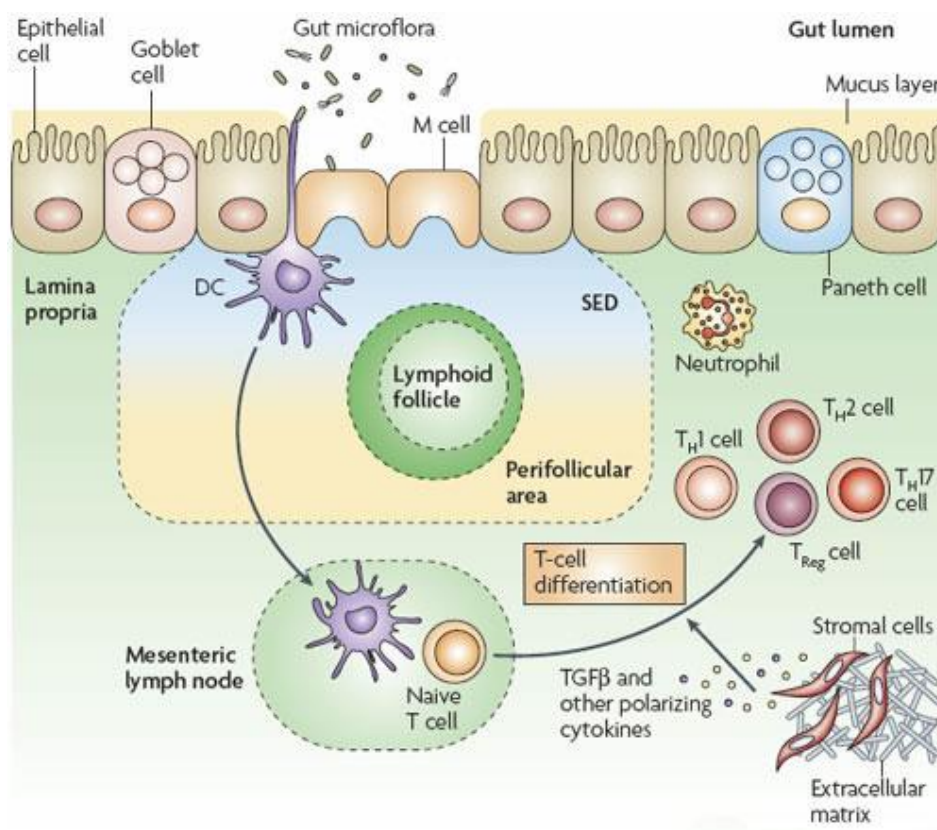
La inmunidad adaptativa tarda más tiempo en desarrollarse y depende fundamentalmente del tipo y número de células T. Numerosos estudios muestran que las dos formas principales de EII (EC y CU) generan distintas respuestas inmunes basadas en el tipo de citocina dominante producida. Así, en la EC se produce una clásica respuesta inmune mediada por linfocitos T colaboradores (helper) tipo 1 (Th1), originada por la exposición de los linfocitos T inmaduros a distintas IL como IL-12, IL-18 ó IL-23. Las células Th1 producen IL-2 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ); el IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales lo que facilita el reclutamiento de células inflamatorias y activa a los macrófagos. Estos últimos, a su vez, producen radicales libres y grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18) que contribuyen a la destrucción tisular. Asimismo, se ha demostrado que los linfocitos T de la mucosa intestinal de los pacientes con EC son resistentes a la apoptosis lo que conduce a la acumulación de células T y perpetuación de la respuesta inflamatoria (Cobrin y Abreu, 2005).

Sin embargo, la respuesta inmune producida en la CU no está tan clara. Parece ser que ocurre una respuesta mediada por linfocitos Th2 atípica, caracterizada por la producción de IL-4 e IL-13. La respuesta Th2 implica la activación de linfocitos con actividad citotóxica innata o natural killer (NK) que pueden ser responsables de la inflamación a través de la producción de IL-13 (Targan y Karp, 2005).

Más recientemente se ha descubierto una tercera subpoblación de células Th, llamadas Th17, las cuales requieren IL-23, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e IL-6 para su diferenciación y crecimiento, siendo su principal producto la IL-17. Estas células median respuestas inflamatorias y daño tisular en infecciones y en condiciones inflamatorias y autoinmunes. De hecho, varios estudios han mostrado su papel en la patogénesis de la EII, detectando la presencia de las células Th17 en la mucosa inflamada de pacientes con EC y CU . (Abraham y Cho, 2009; Catana y cols., 2015)

Por otra parte, las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación especializada de dichas células que actúa suprimiendo la activación del sistema inmune, manteniendo así la homeostasis del sistema y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos. Existen diferentes variedades de estas células, entre las que se incluyen las células T CD4+CD25- que ejercen su función supresora inmune principalmente a través de la secreción de citocinas como la IL-10 y las células T CD4+CD25+FOXP3 que requieren contacto celular y citocinas para su función. En este sentido, varios estudios han detectado una disminución en el número de células Treg en la mucosa inflamada de pacientes con EII (Brimnes y cols., 2005) e investigaciones en modelos animales muestran que la administración de estas células es beneficiosa para la curación de la colitis experimental (Huibregtse y cols., 2007).

**Figura 4. Fisiopatología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal** (Tomado de *Nature Reviews Immunology*). DC- células dendríticas, TGF $\beta$  factor de crecimiento transformante beta, Th1 cell- linfocitos t colaboradores (helper) secretores de IL-17, Treg cell- células T reguladoras.



#### **I.4. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.**

Los objetivos que se persiguen con el tratamiento en la EII son inducir o mantener la remisión (eliminando los síntomas y minimizando los efectos colaterales y los eventos adversos a largo plazo), curar la mucosa, evitar complicaciones (p. ej.: fistulas, estenosis...), mejorar y mantener la calidad de vida, limitar o eliminar el uso de corticosteroides, evitar la hospitalización y la cirugía, y restaurar y mantener la nutrición.

Los pacientes con brotes graves deben ser hospitalizados ya que suelen requerir tratamiento intravenoso, aunque el resto puede recibir tratamiento ambulatorio. En cualquier caso, antes de comenzar el tratamiento de un brote, sea el primero o los sucesivos, es necesario descartar la existencia de posibles desencadenantes del brote, como por ejemplo la toma de medicamentos, (particularmente antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o una gastroenteritis aguda o de colitis específicas asociadas (colitis posradiación, colitis isquémica, colitis infecciosa). Es fundamental determinar la gravedad clínica y endoscópica y la extensión, si no se conocía previamente o si hay sospecha de que haya aumentado, practicando una radiografía simple de abdomen en los brotes graves de CU colitis ulcerosa o de EC enfermedad de Crohn del colon para descartar la existencia de megacolon tóxico (el cual que requiere tratamiento específico). Finalmente, pero no por ello menos importante, es necesario valorar el estado nutricional del paciente y la existencia de manifestaciones extraintestinales que precisen tratamientos específicos.

Dado que la etiología de la EII sigue siendo poco conocida, el tratamiento farmacológico ha ido evolucionando de forma empírica, aunque con una clara dirección sobre el sustrato inflamatorio intestinal. Para ello, se ha ido recurriendo históricamente a los fármacos antiinflamatorios disponibles en cada momento, aprovechando la experiencia clínica de uso. Y cuando el tratamiento farmacológico no permite un adecuado control, es preciso echar mano de la cirugía para corregir el problema.

Como ha sido mencionado previamente, en el caso particular de la EC, el tabaquismo debe ser erradicado de forma inmediata, ya que incrementa notablemente el riesgo de complicaciones y la propia evolución de la enfermedad, aumentando la necesidad de cirugía.

##### **I.4.1.Tratamiento farmacológico**

###### **A) Aminosalicilatos**

Constituyen la primera línea de tratamiento en la CU, tanto en la inducción como en el mantenimiento de la remisión. Son fármacos que derivan del núcleo básico del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), conocido farmacológicamente como mesalazina. Sin embargo, no fue éste el primero de la serie en ser utilizado, sino



la sulfasalazina, constituida por la combinación de una sulfamida (sulfapiridina) y el 5-ASA. Actualmente, la sulfapiridina es considerada como un simple elemento transportador (sin efectos antiinflamatorios) que permite que el 5-ASA se absorba en el colon, siendo el 5-ASA el único principio activo. Al administrarse por vía oral, la sulfasalazina se absorbe en el intestino delgado en torno a un 10% y el restante 90% llega intacto al colon, donde las bacterias anaerobias separan las dos moléculas por medio de una azorreductasa. Una vez escindida la molécula de sulfasalazina, la fracción de sulfapiridina se absorbe y se conjuga con el ácido glucurónico en el hígado para ser eliminada por el riñón. Por su parte, la fracción molecular de 5-ASA se absorbe parcialmente y se excreta por heces (y, en menor medida, por la orina en forma acetilada), aunque la fracción absorbida no parece relacionarse con ningún efecto terapéutico. Tampoco la porción de sulfapiridina tiene efectos terapéuticos, pero se la considera la principal responsable de los efectos secundarios de la sulfasalazina, que aparecen hasta en el 40% de los pacientes y que obligan a su retirada hasta en el cerca del 15% de los casos.

Precisamente, con el fin de evitar los efectos colaterales de la sulfapiridina, se diseñaron otros profármacos de la mesalazina como la olsalazina (un dímero del 5-ASA) o la balsalazida, aunque ninguna de ellas está comercializada en España. Por el contrario, han ido apareciendo nuevas formulaciones de mesalazina con el fin de incrementar su tolerabilidad, generalmente mediante formas de liberación retardadas que impiden la absorción en tramos proximales, y que permiten alcanzar concentraciones adecuadas del fármaco en las áreas inflamadas.

En España, la mesalazina está actualmente disponible como comprimidos gastrorresistentes (Clavesal®, Lixacol®, Mezavant®, Pentasa®, Salofalk®), granulado en sobres (Pentasa®, Salofalk®), supositorios (Clavesal®, Pentasa®, Salofalk®) y espuma para aplicación rectal (Clavesal®, Salofalk®). La sulfasalazina está comercializada en España en forma de comprimidos como Salazopyrina®.

Aunque se desconoce exactamente su mecanismo de acción, se han propuesto diferentes mecanismos que actuarían a nivel local sobre la mucosa afecta, sin que los niveles plasmáticos tengan relación con el efecto terapéutico. Uno de los principales incluye la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y de la lipooxigenasa para disminuir la producción de prostaglandinas (PG) y leucotrienos, respectivamente. La mesalazina también actúa inhibiendo la producción de radicales libres de oxígeno, afecta a la función de linfocitos y monocitos y disminuye la producción de IL-1 y de inmunoglobulinas (Ig).

La sulfasalazina tiene una eficacia modesta en comparación con placebo y es inferior a los corticosteroides para el tratamiento de la EC activa leve a moderada. Tampoco la olsalazina y la mesalazina en dosis bajas

(1 a 2 g / día) son superiores al placebo e igualmente mesalazina en dosis altas (3 a 4,5 g / día) no es más eficaz que el placebo para inducir una respuesta o remisión (Lim, 2010).

La mesalazina oral es superior al placebo para el tratamiento de mantenimiento en la CU. Administrada una vez al día es tan eficaz y seguro como la dosis convencional para el mantenimiento de la remisión en la CU quiescente. No parece haber ninguna diferencia en la eficacia o seguridad entre las distintas formulaciones orales de mesalazina. Los pacientes con CU extensa o con recaídas frecuentes pueden beneficiarse de una dosis mayor de la terapia de mantenimiento, sin que se aparentemente se resienta la seguridad (Feagan, 2012).

Por otro lado, la mesalazina rectal puede considerarse como un tratamiento de primera línea para los pacientes con CU distal leve a moderadamente activa, aunque no están establecidas definitivamente la dosis diaria y la frecuencia óptima; posiblemente, haya que hacer aproximaciones posológicas diferentes en los pacientes según el grado de actividad de la enfermedad y la existencia de enfermedad en el margen proximal (Marshall, 2010). Sin embargo, son necesarios nuevos ensayos clínicos controlados para compararla con corticosteroides rectales. En cualquier caso, la combinación de mesalazina oral y rectal podría ser más eficaz que la monoterapia oral o rectal para la inducción de la remisión (Marshall, 2012).

Los efectos adversos se dan con mayor frecuencia con el uso de sulfasalazina (hasta en un 10-45% de los casos). Los más frecuentemente comunicados son los gastrointestinales (sobre todo náuseas, dolor epigástrico y diarrea), aunque pueden darse cefalea y reducción del esperma, que puede suponer un problema en pacientes varones de CU en edad de procrear. Otros efectos adversos más graves como la pancreatitis o la alveolitis son poco frecuentes.

Aunque se ha demostrado que las nuevas formulaciones de mesalazina pueden ser muy seguras, hasta un 15% de los pacientes pueden presentar intolerancia a la mesalazina, mayoritariamente por molestias gastrointestinales, cefalea o erupciones exantemáticas. Hasta un 3% de los pacientes pueden experimentar reacciones agudas que recuerdan a la propia enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, los aminosalicilatos, independientemente de su formulación galénica, pueden producir toxicidad renal, sobre todo nefritis (más raramente síndrome nefrótico), lo que debe tenerse en cuenta en los pacientes con patología renal previa. Esta circunstancia suele darse durante el primer año de tratamiento y no tiene una clara relación con la dosis.

No existe consenso sobre la monitorización del tratamiento con aminosalicilatos, pero se recomienda, en general, un control con hemograma y función renal (urea y creatinina) antes de comenzar el tratamiento y cada 6 meses o un año en el mantenimiento de la remisión.

## **B) Corticosteroides**

Los corticoesteroides fueron los primeros fármacos en utilizarse ampliamente como tratamiento primario de la EII. Habitualmente producen una supresión importante de la inflamación y un rápido alivio de los síntomas, considerándose el tratamiento estándar de primera línea en los brotes moderados-graves, tanto de la CU como de la EC, pero no tienen indicación en el mantenimiento de remisión y además los efectos colaterales limitan su uso prolongado. A pesar de ello, hasta un 75% de los pacientes con EC y un 65% de aquellos con CU llegan a necesitar tratamiento con corticosteroides en algún momento de su enfermedad. Tienen un potente efecto antiinflamatorio, fruto de su unión al receptor glucocorticoide en el núcleo celular, inhibiendo prácticamente todas las vías de la respuesta inmune, interrumpiendo, por tanto, la cascada inflamatoria: inhiben la expresión de moléculas de adhesión (y, por tanto, el tráfico y la migración de las células inflamatorias a los tejidos afectados), así como la expresión de factores de transcripción nuclear proinflamatorios y, por tanto, la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF; además, inhiben directamente la síntesis proteica e inducen la apoptosis de linfocitos activados.

Los más utilizados son la prednisona y la metilprednisolona, que están disponibles para ser administrados por vía oral o intravenosa (acción sistémica) y la budesonida. Esta última es un potente glucocorticoide que se caracteriza por su escasa biodisponibilidad sistémica; se presenta en cápsulas de liberación ileal (Entocord®, Intestifalk®) y está indicada en el brote leve/moderado de EC ileal o ileocecal a dosis de 9 mg/día durante 8-12 semanas. También puede utilizarse en forma de enema en los casos de CU distal. En la actualidad, no hay evidencia para recomendar el uso clínico de la budesonida oral para la inducción de la remisión en la CU activa; en esta afectación parece que la mesalazina es superior a la budesonida (Sherlock, 2010).

Los corticoesteroides sistémicos son muy efectivos para controlar la enfermedad activa, induciendo la remisión en un 60-90% de los casos, pero no son capaces de inducir una remisión histológica, por lo que no son útiles como terapia de mantenimiento. Independientemente de la localización de la enfermedad, son bastante efectivos en ambas formas de la EII.

Por el contrario, tienen una elevada tasa de efectos secundarios, que aparecen hasta en el 50% de los pacientes. En la mayoría de los casos se trata de efectos secundarios leves, que no conlleva la suspensión

del tratamiento, aunque pueden ser graves e incluso muy graves. De hecho, los corticoides se han asociado a un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con EII. En este sentido, es especialmente importante la mayor susceptibilidad a infecciones cuando se usan dosis superiores a 20 mg de prednisona (o su equivalente en otros corticosteroides) durante periodos superiores a 6 semanas; este mayor riesgo de infecciones incluye infecciones postoperatorias, abscesos abdominales o sepsis. Este riesgo es aún mayor si se asocian a otros inmunosupresores o anti-TNF. Si la duración del tratamiento con corticoides es menor de un mes pueden suspenderse abruptamente; si la duración es de 1-3 meses, se recomienda hacerlo paulatinamente.

El esquema más habitual para inducir a la remisión es prednisona (o su equivalente en otros corticosteroides) a dosis de 1-1,5 mg/kg/día (hasta un máximo de 60 mg/día) por cortos períodos de tiempo (4 semanas) y con un descenso escalonado de la dosis (5 mg semanales). Hasta un 35% de los pacientes con EC pueden llegar a ser eventualmente cortico-dependientes y un 20% cortico-resistentes. Su uso, debe ser evaluado de forma individual por los efectos secundarios que pueden presentar, entre los que se encuentran: alteración del crecimiento, retención de líquidos, ganancia de peso, redistribución del tejido adiposo, hipertensión, alteración del metabolismo óseo, alteraciones dermatológicas, hiperglicemia, cataratas subcapsulares, miopatías, pseudoartritis y alteraciones emocionales.

### **C) Modificadores de la inmunidad Inmunosupresores**

El avance y el mejor entendimiento en el campo de la fisiopatología y en el área de la terapéutica de la EII han derivado en un progresivo aumento del uso de fármacos inmunosupresores en los últimos años, tanto en la EC como en la CU, ampliándose sus indicaciones y planteándose nuevas estrategias.

Los inmunosupresores se han utilizado típicamente para limitar o eliminar el uso permanente de corticosteroides, en caso de corticodependencia en la EII con actividad crónica persistente, y para el tratamiento de complicaciones penetrantes de la EC (sobre todo de las fístulas). Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha consolidado la práctica de introducir precozmente estos fármacos para prevenir o reducir las complicaciones de la enfermedad. Los más utilizados son tiopurinas (mercaptopurina y azatioprina), inhibidores de la calcineurina (ciclosporina metotrexato y tacrolimuús) y metotrexato.

#### **C. 1. Tiopurinas**

La azatioprina (Imurel®) y su metabolito 6-mercaptopurina (Mercaptopurina Aspen®) (6-MP) son los inmunosupresores más empleados en la EII y tienen una seguridad y eficacia similares. El efecto terapéutico

de estos fármacos se debe a la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, a la inhibición de la proliferación celular y a la acción bloqueadora de la coestimulación del linfocito T, que le confiere una acción inmunosupresora e induce la apoptosis.

La eficacia terapéutica se maximiza después de seis a doce semanas de iniciado el tratamiento. Las indicaciones aceptadas internacionalmente para su uso son: EC fistulizante, corticodependencia y mantenimiento de la remisión en ambas formas de EII. Las indicaciones aún debatidas por la falta de suficiente evidencia científica son la prevención de la recurrencia postquirúrgica en la EC, tratamiento de la EC en conjunto con agentes biológicos y tratamiento de la EII corticorresistente.

La administración temprana de estos inmunosupresores parece estar asociada con una mejor evolución de la EII, con un mejor patrón de crecimiento, un menor número de recaídas, menos complicaciones fistulizantes o estenóticas y menor requerimiento de cirugía. La dosis efectiva de azatioprina es de 2-3 mg/kg/día, mientras que la dosis de mercaptopurina es de 1,5 mg/kg/día. Es importante realizar una estrecha monitorización con hematimetría completa y pruebas funcionales hepáticas especialmente durante los primeros meses del tratamiento.

La azatioprina se metaboliza en el hígado mediante la enzima glutatión-S-transferasa en mercaptopurina. En el hígado, actúan sobre esta última, tres enzimas que la pueden transformar en diversas sustancias, algunas de ellas potencialmente tóxicas y que pueden ser causa de la mayor parte de los efectos secundarios. Por ello, es conveniente medir la actividad de la enzima tiopurín-metil-transferasa (TPMT), antes de empezar el tratamiento, para evitar la aparición de efectos tóxicos graves.

El uso de tiopurinas se asocia con un descenso del 41% (RR=0,59; IC95% 0,48 a 0,73) en el riesgo de la resección quirúrgica en pacientes con EC. A pesar de ello, una gran proporción de estos pacientes siguen requiriendo cirugía (Chatu, 2014). La azatioprina y la 6-mercaptopurina pueden permitir a los pacientes reducir el consumo de esteroides, aunque parece ser inferiores a infliximab en este aspecto. Sin embargo, la combinación de azatioprina e infliximab parece ser superior al infliximab solo (Chande, 2013).

Igualmente, el tratamiento con azatioprina parece ser más eficaz que el placebo para mantener la remisión en la CU. La azatioprina o 6-mercaptopurina pueden ser eficaces como tratamiento de mantenimiento en pacientes que han fracasado o no pueden tolerar la mesalazina o sulfasalazina y para los pacientes que requieren de ciclos repetidos de corticosteroides (Timmer, 2012).

Una vez confirmada la eficacia y la tolerabilidad a los efectos adversos, se aconseja mantener el tratamiento durante 4 años como mínimo. A pesar de no existir evidencia de efectividad a más largo

plazo, se recomienda mantener el tratamiento, ya que se ha visto que su supresión se asocia a un elevado riesgo de recidiva tanto en los pacientes con CU como con EC.

Se deben realizar controles de hemograma, pruebas de función hepática y amilasa a los 15, 30, 60 y 120 días tras iniciar el tratamiento, seguir posteriormente cada 2 meses el primer año y cada 3 meses a partir del segundo año. Si los leucocitos bajan hasta cifras hacer un control analítico; si bajan por debajo de 3.000/mL, se suspenderá el fármaco hasta la normalización, se reintroducirá con dosis menores y se hará un control analítico estrecho.

Los efectos adversos que produce la azatioprina se clasifican en idiosincrásicos o alérgicos y en dosis-dependientes. Los efectos adversos de tipo alérgico incluyen pancreatitis, erupciones exantemáticas y fiebre, mientras que los efectos adversos dosis-dependientes incluyen la mielotoxicidad (descenso de linfocitos – linfopenia – o de leucocitos – leucopenia –) y la hepatotoxicidad. Los efectos adversos más frecuentes son las reacciones de hipersensibilidad, la pancreatitis, la mielotoxicidad, las infecciones, la intolerancia digestiva y el linfoma. La inmunosupresión producida por la azatioprina puede favorecer el desarrollo de infecciones (0,3-7,4%). Las infecciones más frecuentes son las virales, como las producidas por el virus herpes simple, varicela zóster, citomegalovirus o virus de Epstein-Barr. Por otro lado, la azatioprina se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer, particularmente neoplasias hematológicas (linfomas, etc.).

## **C.2. Metotrexato**

Está indicado en los pacientes con EC que sean refractarios o intolerantes al tratamiento con tiopurinas. En este sentido, hay pruebas de que el metotrexato intramuscular (25 mg/semana) proporciona un beneficio clínico neto en la inducción de la remisión y la suspensión total de esteroides en pacientes con EC refractaria. Por el contrario, el empleo de dosis bajas por vía oral no parece proporcionar un beneficio significativo en relación con placebo o un comparador activo; tampoco la adición de metotrexato a la terapia con infliximab parece proporcionar un beneficio adicional a la monoterapia con infliximab (McDonald, 2012). La evidencia disponible es insuficiente para recomendar el uso de metotrexato para mantener la remisión en pacientes con colitis ulcerosa CU (El-Matary, 2009).

Los efectos secundarios, como la mielotoxicidad, mucositis, toxicidad gastrointestinal o alteraciones hepáticas, están relacionados con su mecanismo de acción (es un antimetabolito del ácido fólico, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos). La suplementación con ácido fólico o folínico disminuye la incidencia de

efectos adversos (especialmente gastrointestinales) sin reducir la eficacia terapéutica. Se aconseja la realización de hemograma y pruebas de función hepática inicial y cada 2-3 meses durante el tratamiento. En un 10-18% de los pacientes se retira el tratamiento por los efectos adversos. Si las cifras de aspartato aminotransferasa (AST) se duplican, parece razonable suspender el tratamiento.

### **C.3. Ciclosporina y tacrolimús**

La ciclosporina (Sandimmun®) es un inmunosupresor que actúa inhibiendo la calcineurina, con lo que reduce la producción de anticuerpos dependientes de linfocitos T facilitadores, así como la producción y liberación de diversas linfocinas, particularmente de IL-2. Está indicada en la inducción de la remisión en los pacientes con CU corticorretractaria (30-40% de los casos), en los que el fármaco permite alcanzar un control clínico en más del 60% de ellos. Se recomienda utilizar la ciclosporina por vía intravenosa a dosis de 2 mg/kg/día y luego pasar a 8 mg/kg/día por vía oral. En pacientes con EC es especialmente útil en las fístulas refractarias. Puede ser utilizada por vía intravenosa para inducir a la remisión o por vía oral durante períodos breves durante la fase temprana del mantenimiento de la remisión. Por el contrario, las dosis bajas (5 mg / kg / día) de ciclosporina oral no son efectivas para la inducción de la remisión en la EC y las dosis más altas de ciclosporina no es probable que sean de utilidad para el tratamiento a largo plazo de la EC debido al riesgo de nefrotoxicidad y la disponibilidad de otras intervenciones comprobadas (MacDonald, 2005).

Los efectos adversos más frecuentes son la nefrotoxicidad, hipertensión arterial, hiperplasia gingival, hipertriosis y náuseas. Otros menos frecuentes son la toxicidad hepática, convulsiones (favorecidas por hipomagnesemia e hipocolesterolemia), alteraciones hematológicas, anafilaxia e infecciones oportunistas. Por otro lado, existen pruebas limitadas de que la ciclosporina es más efectiva que el tratamiento estándar de la CU grave. La respuesta relativamente rápida hace potencialmente atractivo al tratamiento de corta duración con ciclosporina (Shibolet, 2005).

El tacrolimuús es otro inmunosupresor farmacológicamente relacionado con la ciclosporina, que actúa impidiendo la activación de linfocitos T en respuesta a estímulos mitogénicos o antigénicos. Es unas cien veces más potente que la ciclosporina inhibiendo la liberación de citocinas. Inhibe también la activación de los linfocitos B producida por anticuerpos. Aunque en España no está autorizado su uso en EII, se ha utilizado en sus dos formas, especialmente en forma tópica (Protopic®) para la EC perianal o fistulizante refractaria a tratamiento convencional con esteroides, antibióticos o tiopurinas, y por vía oral (Adoport®,

Advagraf®, Mediograf®, Prograf®) en la CU resistente a corticoides, como una alternativa a la ciclosporina intravenosa, a dosis de 0,15 mg/kg/día con ajuste posterior según niveles plasmáticos. Aunque el tacrolímús puede ser eficaz para la mejoría clínica a corto plazo en estos pacientes, los datos clínicos disponibles son escasos y de no excesiva calidad metodológica (Baumgart, 2008). Por otro lado, sus efectos indeseables más comunes son: nefrotoxicidad, parestesias, hipertensión arterial e infecciones oportunistas entre otras.

#### **D) Terapias biológicas: fármacos anti-TNF**

Las terapias biológicas están constituidas por fármacos de carácter proteico (mayoritariamente, anticuerpos monoclonales o fracciones de estos) dirigidos a regular la actividad de las proteínas que ejercen un papel clave en la compleja red de la respuesta inmune. A fecha de hoy en España sólo hay tres fármacos aprobados para su empleo en la EII: infliximab, adalimumab y golimumab, aunque este último sólo lo está en la colitis CU. Todos ellos son anticuerpos monoclonales IgG1 que actúan inhibiendo el TNF, por lo que globalmente reciben el nombre de agentes anti-TNF. El TNF es una potente citocina proinflamatoria que ejerce múltiples funciones en el desarrollo de la inflamación a diversos niveles; de ahí la importancia de su inhibición en la EII.

El infliximab (Remicade®) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino que forma rápidamente complejos estables con el TNF humano, un proceso que es paralelo a la pérdida de bioactividad del TNF. La evaluación histológica de biopsias de colon en pacientes con EII, obtenidas antes y 4 semanas después de la administración de infliximab, revela una reducción sustancial del TNF detectable. El tratamiento con infliximab en pacientes con EC también se asoció con una reducción sustancial de la proteína C reactiva (PCR), marcador inflamatorio sérico normalmente elevado. El análisis de células mononucleares de la lámina propia obtenidas por biopsia de la mucosa intestinal indica que el tratamiento con infliximab causa una reducción en el número de células capaces de expresar TNF e IFN $\gamma$  interferon-gamma y de la infiltración de células inflamatorias en las áreas afectadas del intestino, así como la presencia de marcadores de inflamación en estos lugares.

Por su parte, el adalimumab (Humira®) se une al TNF, impidiendo que éste interactúe con ninguno de sus dos tipos de receptores (p55 y p75), cualquiera que sea su forma: ligados a la membrana celular (elemento de anclaje del TNF) y en forma soluble (regulador de la actividad biológica del TNF, según las necesidades fisiológicas). La consecuencia del bloqueo del TNF es la modulación de las respuestas biológicas a este último, entre las que cabe citar cambios en los niveles de las moléculas de adhesión responsable de la



migración leucocitaria (ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1). Como ocurre con el infliximab, tras la administración de adalimumab se aprecia una rápida disminución de los niveles de PCR, así como de la velocidad de sedimentación eritrocitaria y de IL-6. Igualmente, se puede apreciar una disminución de los niveles séricos de metaloproteinasas matriciales (MMP-1 y MMP-3), responsables de la remodelación.

El golimumab (Simponi®) se une específicamente al TNF, impidiendo la unión de éste a su receptor. Golimumab reduce *in vitro* la expresión de moléculas de adhesión como selectina E, endotelina 1 (VCAM-1) e intercelular 1 (ICAM-1) de la célula endotelial, y disminuye la producción de citocinas como IL-6, IL-8 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

Estos fármacos difieren en la forma de administración: el infliximab se administra mediante perfusión por vía intravenosa y el adalimumab y el golimumab se administran por inyección subcutánea.

Los anti-TNF han demostrado ser eficaces tanto en el tratamiento de la EC (aunque golimumab no está autorizado para esta indicación) como en el de la CU, induciendo y manteniendo tanto la respuesta clínica como la cicatrización de la mucosa. Sin embargo, no todos los pacientes necesitan tratamiento con terapia biológica, ya que muchos pacientes presentan un curso benigno y no necesitarán, durante su evolución, tratamiento con inmunosupresores o anti-TNF. Actualmente, se estima (Angós, 2013) que alrededor del 15% de los pacientes con EII reciben tratamiento biológico en este momento. En pacientes con EC, un tratamiento anti-TNF puede limitar la incidencia de eventos adversos graves (Zhang, 2013).

Actualmente las indicaciones aprobadas para infliximab y adalimumab son inducción de la remisión en la EC activa grave en pacientes que no han respondido al tratamiento con corticoides y/o inmunosupresores o que sean intolerantes o tengan contraindicaciones a los mismos, EC perianal fistulizante, en pacientes que no han respondido a pesar de un curso de terapia completo y adecuado con el tratamiento convencional (incluidos antibióticos, drenaje y terapia inmunosupresora), tratamiento de mantenimiento de la enfermedad fistulizante si no existen otras terapias más válidas (cirugía o inmunomoduladores) y en manifestaciones extraintestinales de la EII. Los datos clínicos contrastados indican que una sola infusión i.v. de 5 mg / kg de infliximab puede ser efectiva para inducir la remisión en la EC, mientras que no se dispone de ninguna evidencia que apoye el uso de etanercept en esta indicación (Akobeng, 2003).

Tanto el infliximab como el golimumab están indicados en la inducción de la remisión de la CU activa grave en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada al tratamiento convencional, incluyendo corticoides, azatioprina u otros inmunosupresores, o que son intolerantes o tengan contraindicaciones para utilizar esos medicamentos. Su eficacia ha sido contrastada, no solo en términos de inducción de la remisión

clínica, sino también promoviendo la curación mucosal y reduciendo la necesidad de colectomía al menos en el corto plazo (Lawson, 2006). Por otro lado, infliximab y ciclosporina parecen ser comparables cuando se utilizan como terapia de rescate en estos pacientes (Chang, 2013).

Otros fármacos biológicos, como el certolizumab, el ustekinumab y el natalizumab, parecen tener una efectividad similar, pero su uso en la EII no está aprobado en España.

Los datos combinados sugieren que el natalizumab es eficaz para la inducción de la respuesta clínica y la remisión en algunos pacientes con moderada a severamente la EC activa (MacDonald, 2007). Aunque se han descrito algunos casos aislados de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) asociada a virus JC (un poliomavirus de la familia de los papovirus), esta patología ocurre casi exclusivamente en personas con una inmunodeficiencia grave; de hecho, en el 80% de pacientes con LMP, la causa de su inmunodeficiencia es la infección por el virus VIH, siendo el resto pacientes leucemias o linfomas, o tratados con agentes inmunosupresores para la prevención del rechazo en trasplante de órganos o tejidos. Estudios recientes confirman que el certolizumab puede ser un tratamiento eficaz para la EC como terapia de mantenimiento y con un perfil de seguridad favorable (Da, 2013).

Aunque el infliximab dispone de más experiencia clínica y a más largo plazo, todos los anti-TNF disponibles parecen tener, en general, un perfil de eficacia y seguridad similar, por lo que, en aquellos casos en los que sea factible, la elección suele depender fundamentalmente de las características del paciente, disponibilidad, vía de administración, costes y guías nacionales.

Los pacientes con una infección activa no deben recibir tratamiento biológico hasta que la infección no esté controlada, dado el riesgo de presentar un problema séptico. La situación que se presenta con más frecuencia en estos pacientes es la aparición de abscesos en la región perianal o intraabdominales que tienen que ser drenados correctamente antes de iniciar el tratamiento biológico. De la misma manera, cualquier otra infección activa, como la del virus de la hepatitis B o C o por el virus de la inmunodeficiencia humana, tiene que excluirse o tratarse antes de iniciar el tratamiento. En general, se estima que la terapia anti-TNF se duplica ( $RR=2.05$ ;  $IC_{95\%}$  1,10 a 3,85) el riesgo de infecciones oportunistas en pacientes con EII y en particular la tuberculosis ( $RR=2,52$ ;  $IC_{95\%}$  0,62 a 10,21) (Ford, 2013).

De especial importancia es el cribado para la tuberculosis latente, que debe realizarse, inexcusablemente, antes de iniciar tratamiento con anti-TNF, ante el riesgo de desarrollar una tuberculosis diseminada, siguiendo en cada país las guías locales establecidas para esta indicación. En nuestro país, el cribado incluye la realización de una historia clínica detallada con relación al riesgo epidemiológico de contacto con

pacientes con tuberculosis, la presencia de una radiografía de tórax normal y la prueba de la tuberculina y booster negativos.

A todos los pacientes que inician un tratamiento biológico se les debe revisar su calendario vacunal y actualizarlo en caso necesario, incluyendo las vacunas indicadas en los pacientes con inmunosupresión, como la vacuna de la gripe, que tiene que administrarse anualmente de forma estacional, o la del neumococo. Si se utiliza alguna vacuna con virus vivos atenuados, como la de la varicela, debe esperarse entre 4 semanas y 3 meses antes de iniciar el tratamiento biológico, por el riesgo de reactivación de la infección.

En general, se considera que los pacientes con historia de neoplasia (excluyendo el cáncer cutáneo de tipo no melanoma) o de linfoma no parecen los más adecuados para iniciar tratamiento con anti-TNF. También en los pacientes con insuficiencia cardíaca grave o enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central (esclerosis, etc.) deben valorarse otras modalidades de tratamiento.

Por otro lado, las terapias anti-TNF parecen aumentar el riesgo de complicaciones posoperatorias. En concreto, el riesgo global aumenta en un 73% (RR=1,73; IC95% 1,14 a 2,17), aumentando el de infecciones posquirúrgicas en un 56% (RR=1,56; IC95% 1,09 a 2,24). Aunque el aumento del riesgo no es excesivo, y bien pudiera reflejar un cierto grado de confusión residual en lugar de un efecto biológico real, debe sopesarse adecuadamente antes de una intervención quirúrgica en estos pacientes (Narula, 2013).

No obstante, en general, la mayoría de los pacientes que empiezan tratamiento biológico deberían mantenerlo a medio plazo. Desafortunadamente, hay pocos datos para hacer recomendaciones a largo plazo, más allá de un año, sobre cuándo se puede suspender el tratamiento con anti-TNF. Por otro lado, se estima que aproximadamente un tercio de los pacientes con EC tratados con anti-TNF son no adherentes, particularmente en caso de las mujeres (Fidder, 2013).

### **E) Antibióticos**

Ciertos antibióticos han demostrado cierta utilidad en algunas formas clínicas de EII, disminuyendo posiblemente la inflamación crónica de la mucosa intestinal al reducir la concentración luminal de bacterias y modular la respuesta inmune mediada por células.

Los antibióticos más utilizados son ciprofloxacino y metronidazol, aunque experimentalmente se han usado también claritromicina y rifabutina. En general, se emplean en la inducción de la remisión de la enfermedad perianal y la EC fistulizante, en la prevención de la recurrencia posquirúrgica de la EC (concretamente, la

pauta corta de metronidazol) y en algunas situaciones especiales en pacientes con CU, como el megacolon tóxico o la fiebre de origen no intestinal.

El ciprofloxacino es una fluoroquinolona con actividad bactericida por inhibición de la ADN-girasa de las bacterias, lo que impide la replicación del ADN bacteriano. Tiene un amplio espectro bacteriano frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Por su parte, el metronidazol tiene una acción bactericida, especialmente sobre bacterias anaerobias; además, presenta cierta acción inmunomoduladora con inhibición de la inmunidad celular y de la formación de granulomas.

El antibiótico más utilizado en la EII pediátrica es el metronidazol, a dosis de 15-20 mg/kg/día. Parece ser más efectivo en la EC perianal fistulizante que en sus presentaciones ileocolónicas y en la CU en general. En el caso del ciprofloxacino, los efectos secundarios más frecuentes son los digestivos, como náuseas, vómitos y diarreas. Además pueden aparecer alteraciones neurológicas, hematológicas, dérmicas, anafilácticas y toxicidad hepática. En asociación con la ciclosporina puede producir alteraciones de la función renal.

Entre los efectos adversos producidos por metronidazol se incluyen náuseas, sabor metálico, vómitos, cefaleas, urticaria, ardor uretral o vaginal y dispepsia que pueden presentarse hasta en el 90% de los pacientes. No obstante, el efecto adverso más significativo es la neuropatía periférica en las extremidades que con relativa frecuencia es irreversible, dependiente de la dosis y que por lo general aparece después de seis meses de tratamiento (hasta en un 50% de los casos). Este efecto es dependiente de la dosis y por lo general aparece después de seis meses de tratamiento. La mayoría de los efectos adversos revierten al suspender la medicación, con excepción de la neuropatía que con relativa frecuencia es irreversible. Presenta además reacción disulfirámica ante la ingesta de alcohol (efecto antabús).

## **G. Otros tratamientos**

Dado el carácter crónico y discapacitante que tienen las EII y la ausencia de un tratamiento auténticamente curativo, se han hecho numerosas tentativas de incorporar otros medicamentos o incluso suplementos nutricionales para corregir o potenciar la eficacia de los medicamentos actualmente autorizados para esta indicación. En estas condiciones, es obvio indicar que han proliferado multitud de propuestas, muchas de ellas carentes del menor fundamento científico o clínico.

Entre los medicamentos estudiados con mayor rigor se encuentra la naltrexona en dosis bajas. Los datos de un pequeño estudio sugieren que ésta podría proporcionar un beneficio en términos de respuesta clínica y

endoscópica en pacientes adultos con EC activa. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, ya que se basan en un pequeño número de pacientes y la calidad metodológica del estudio es baja (Segal, 2014).

Mucho más abundante es la bibliografía relativa a la utilización del aceite de pescado, que no encuentra evidencia de eficacia (De Ley, 2007). Tampoco se encontró una evidencia clínica clara que apoye el uso de ácidos grasos omega 3 para mantener la remisión en la CU (Turner, 2007) o en la EC (Swan, 2013).

Atendiendo a la observación de que la CU es una enfermedad que afecta mayoritariamente a los no fumadores, que los fumadores intermitentes a menudo experimentan mejoría en sus síntomas mientras se fuma y que algunos de los no fumadores con CU que empezaron a fumar entraron en remisión, se han desarrollado algunos ensayos controlados para evaluar la eficacia de la nicotina transdérmica para la inducción de la remisión en la CU. Los resultados de una revisión demuestran que es superior al placebo, pero sin ninguna ventaja significativa para el tratamiento de nicotina transdérmica comparado con el tratamiento farmacológico estándar. Además, los eventos adversos asociados con la nicotina transdérmica son significativos y limitan su uso en algunos pacientes (McGrath, 2004).

Por otro lado, además de los tratamientos específicamente antiinflamatorios, los pacientes con EII requieren frecuentemente otros fármacos para controlar determinados síntomas y prevenir estados de deficiencia nutricional y, en particular vitamínica. En este sentido, es común la utilización de loperamida si la colitis no tiene un carácter fulminante o colestiramina, si el paciente ha sido previamente sometido a una resección del íleon. El dolor es habitualmente tratado con paracetamol, recurriéndose a la codeína (sola o combinada con el propio paracetamol) cuando es preciso.

Finalmente, el trasplante de la microbiota fecal constituye un nuevo enfoque para el tratamiento de la CU. Se trata de un proceso de transmisión de la microbiota intestinal de un donante sano para restaurar la microbiota del receptor que tiene algún problema de disbiosis o alteración de su microbiota intestinal. No obstante, cabe destacar que este procedimiento se encuentra en investigación y se realiza en determinados hospitales bajo rigurosa vigilancia médica (Smits LP, 2013)

#### **I.4.2. Tratamiento quirúrgico**

En la CU, la cirugía (colectomía total con descenso ileoanal) es curativa y se recomienda de forma electiva en los brotes graves refractarios al tratamiento farmacológico o cuando no sea posible lograr una adecuada calidad de vida con éste. Se estima que el 25–30% de los pacientes pueden necesitar cirugía. Las opciones

quirúrgicas son ileostomía transitoria, proctocolectomía total más ileostomía permanente y anastomosis del pouch ileo anal (IPAA).

Por su parte, la cirugía para la EC es solo paliativa y se recomienda únicamente en condiciones refractarias al tratamiento farmacológico y casos seleccionados, ya que existe una alta tasa de recurrencia posterior; no obstante, el 70–75% de estos pacientes necesitan cirugía en algún momento para aliviar los síntomas si fracasa el tratamiento medicamentoso, o para corregir complicaciones. Las opciones quirúrgicas consisten en el drenaje de los abscesos, resección segmentaria, plastia de las estenosis con preservación del intestino, anastomosis ileorectales o ileocolónicas, y derivación transitoria mediante ileostomía/colostomía en fístula perianal severa. Una reciente revisión ha documentado la reducción de las complicaciones perioperatorias en los pacientes sometidos a resección laparoscópica, en comparación con la resección abierta (cociente de riesgo 0,71; IC95% 0,58 a 0,86;  $p=0,001$ ). No hubo diferencias significativas en la tasa de recurrencia quirúrgica (0,78; IC95% 0,54 a 1,11;  $p=0,17$ ) o en la obstrucción del intestino delgado (0,63; IC95% 0,28 a 1,45;  $p=0,28$ ) entre ambas técnicas (Patel, 2013).

### **I.4.3. Tratamiento no farmacológico**

#### **I.4.3.1. Dieta y soporte nutricional**

La enfermedad EII se asocia frecuentemente con deficiencias nutricionales que pueden manifestarse en forma de adelgazamiento, anemia, descalcificación ósea y retraso en el desarrollo estatuoponderal y sexual en los niños y adolescentes. Las causas de esta desnutrición son diversas:

- Reducción de la ingesta de alimentos, ya sea porque la propia enfermedad les quita el apetito, porque tienen náuseas, vómitos o dolor abdominal al comer o porque restringen la toma de ciertos alimentos por indicación médica.
- Alteraciones intestinales que provocan la malabsorción de los alimentos ingeridos; aunque esto se produce sólo en la EC que afecta al intestino delgado.
- Pérdida de proteínas y otros nutrientes a través de la mucosa intestinal inflamada y ulcerada.
- Incremento en el consumo de energía provocado por la inflamación intestinal.

Actualmente no existen datos científicamente contrastados que permitan afirmar que ningún alimento en concreto esté involucrado en el desencadenamiento, empeoramiento o perpetuación de la actividad inflamatoria en la CU y en la EC, por lo que en ambos casos se debe evitar cualquier restricción en su dieta, la cual será libre y variada, rica en proteínas, hierro y calcio, todo ello para prevenir y corregir la

desnutrición; si acaso, la única restricción dietética durante los brotes de actividad es la de aquellos alimentos que provoquen de forma repetida y sistemática un empeoramiento de sus síntomas (con mayor frecuencia de diarrea y/o dolores abdominales), tal como la leche en los pacientes intolerantes a la lactosa, que deben sustituir por yogur y quesos curados (que tienen poca lactosa).

Algo similar puede indicarse sobre el consumo de fibra durante los brotes, en los que se aconseja una dieta con pocos residuos, sobre todo en los pacientes con EC extensa y con estenosis intestinales, pues la fibra podría producir obstrucciones intestinales o dolores por la dificultad de paso por las zonas estenosadas. Por ello se aconseja eliminar la fibra insoluble, contenida en los alimentos integrales, el salvado (de trigo, avena, centeno, etc.) y algunos vegetales “leñosos”, como los espárragos, las alcachofas, las legumbres, etc. Además, este tipo de fibra puede dañar y erosionar la mucosa intestinal inflamada y ulcerada. El otro tipo de fibra, la soluble, contenida en las frutas y en algunas legumbres, produce menos residuos que la insoluble y se suele tolerar mejor. Asimismo, hay que tener en cuenta que el plátano y el membrillo son astringentes, por lo que serán mejores que las cerezas, las ciruelas o las naranjas, que son laxantes.

Durante los periodos de remisión, los pacientes deben seguir una dieta normal, salvo aquellos con EC con estenosis fibrosas persistentes, que deberán evitar la fibra insoluble y reducir la fibra soluble. Cuando los pacientes no pueden tomar una dieta normal, se recurre a la nutrición artificial, enteral o parenteral, lo que suele ocurrir en los pacientes muy desnutridos durante los brotes graves, en los que la desnutrición puede ser más rápida. Adicionalmente, parece que la nutrición enteral tiene un efecto antiinflamatorio sobre la mucosa afectada por la EC, por lo que se está utilizando como tratamiento en los niños con brotes para evitar el efecto perjudicial de los corticosteroides sobre su crecimiento. No obstante, el tratamiento con corticosteroides se considera más efectivo que la nutrición enteral para inducir la remisión de la EC activa y no parece que la composición proteica de la dieta influya en la eficacia de la nutrición enteral en el tratamiento de la EC activa. Parece existir una cierta tendencia favorable aunque no significativa a favor de un contenido muy bajo contenido de grasa y / o de triglicéridos de cadena larga (Zachos, 2007).

Por su parte, los pacientes de EC con afectación gastroduodenal, enfermedad perianal o manifestaciones extradigestivas graves no son candidatos para recibir nutrición enteral como tratamiento primario. En términos generales los pacientes con afectación cólica extensa sin afectación ileal responden peor. Aunque no existe un consenso, la reintroducción alimentaria debe ser gradual y el volumen de ingesta diario de la fórmula enteral debe disminuirse a lo largo de tres o cuatro semanas. La nutrición parenteral es útil en los casos de estenosis, fístulas o malnutrición severa y en casos de CU como apoyo pre y postquirúrgico

### **I.4.3.2. Interés de los productos naturales en el tratamiento de la EII**

El tratamiento convencional de las EII puede reducir los períodos de enfermedad activa y ayudar a mantener remisión, pero estos tratamientos a menudo traen resultados secundarios y los pacientes se vuelven refractarios. Desafortunadamente, la aparición de efectos secundarios asociados a estos tratamientos podría dar lugar a reacciones adversas o falta de respuesta, lo que podría limitar su uso clínico. La falta de un tratamiento coste-efectivo y un período refractario de remisión contribuyen a que muchos enfermos con EII recurran a su vez a tratamientos no convencionales, con la esperanza de disminuir los síntomas de la EII activa. Se estima que el 40% de los pacientes con EII usan alguna forma de terapia con vitaminas, productos herbolarios, o suplementos dietéticos. Las propiedades terapéuticas de muchas de estas terapias complementarias a base de productos naturales, sobretudo las de origen vegetal, ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda y obtención de drogas alternativas que presenten efectos colaterales en menor medida respecto a las convencionales y, de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan sus propias plantas (Langmead y cols., 2002).

Entre estas alternativas medicinales potentes que han sido estudiadas en los últimos años en la EII se incluyen:

#### **Probióticos y prebióticos**

Atendiendo a la relación entre EII y la flora intestinal, se ha estudiado el papel de los agentes probióticos (que, según la organización mundial de la salud (OMS), son microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped) en su tratamiento. Supuestamente, la incorporación de ciertos microorganismos podría tener efectos beneficiosos al contribuir el equilibrio de la flora intestinal e, incluso, producir ciertos efectos sobre la mucosa digestiva. Fundamentalmente, se ingieren como parte de alimentos fermentados, sobre todo en lácteos frescos, y también como nutracéuticos en forma de cápsulas. No obstante, no se disponen de ensayos clínicos controlados que demuestren un papel que exceda el de su excelente tolerabilidad digestiva y sus buenas propiedades nutricionales (Butterworth, 2008; Naidoo, 2011). Fundamentalmente, se administran con



yogur u otros derivados lácteos fermentados. No obstante, no se dispone de ensayos clínicos controlados que demuestren un papel que exceda el de su excelente tolerabilidad digestiva y sus buenas propiedades nutricionales (Butterworth, 2008; Naidoo, 2011).

La actividad probiótica ha sido asociado principalmente con lactobacilos, bifidobacterias, *E. coli*, y *Saccharomyces boulardii* (Shanahan F.,2000). En la colitis experimental, ha sido descrito cómo la administración con lactobacilos por vía oral o vía rectal reduce significativamente la severidad y sintomatología de la CU colitis en ratones deficientes en IL-10 (Schultz M., 2002, Mao Y., 1996)). Fruto de diversos estudios clínicos, se ha sugerido que la administración de probióticos puede contribuir a una mejora en la sintomatología de aquellos pacientes con CU, EC y bursitis [Miura T., 2004, Feagan BG, 1995).

En cuanto a los prebióticos se trata de ingredientes no digeribles de los alimentos que tienen efectos beneficiosos para el hospedador porque producen una estimulación selectiva del crecimiento y de la actividad de la microbiota. Algunos ejemplos son: inulina, fructooligosacáridos y oligofructosacáridos. De forma similar, también se ha estudiado el uso de simbióticos, combinaciones de probióticos y prebióticos que se administran por vía oral de modo simultáneo para conseguir efectos sinérgicos entre los dos componentes, en casos de EII (Ghouri YA, 2014)

## Resveratrol

El resveratrol es un potente antioxidante natural presente en las uvas, el vino tinto y las nueces. Además de su capacidad antioxidante, tiene propiedades antiinflamatorias y antitumorales que lo convierten en una molécula con grandes expectativas farmacológicas. Concretamente, su potente acción antiinflamatoria ha sido descrita en diversos modelos experimentales murinos de CU aguda y/o crónica inducida por dextrano sulfato sódico (DSS), y ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) así como en ratones deficientes en IL-10. (Martín y cols., 2006; Martín y cols., 2004; Sánchez-Fidalgo y cols., 2010; Abdallah y cols., 2011; Singh y cols., 2012; Yao y cols., 2011; Youn y cols., 2009; (Martín AR y cols, 2004, , Martín AR y cols, 2006). Su mecanismo de acción parece estar relacionado estrechamente con su capacidad de suprimir diversas citocinas y enzimas proinflamatorias entre las cuales se incluyen la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa (COX)-2 a través de la inhibición de la translocación del factor de transcripción NFκB, así como una reducción en la activación de los linfocitos Th1 (Singh UP y cols., 2010). Resultados similares han sido descritos en animales con cáncer colorrectal inducido azoximetano tratados con resveratrol (Cui y cols., 2010). Recientemente, un estudio clínico realizado en pacientes con CU ha revelado cómo la administración de 500 mg de resveratrol mejora la calidad de vida de estos pacientes, a la vez que reduce el grado de severidad y síntomas clínicos de la enfermedad (Samsami-Kor y cols., 2015).

## Curcumina

La curcumina, que se encuentra en la planta *Curcuma longa*, es un compuesto natural que se utiliza como especia en el curry en polvo. Entre sus ingredientes, se incluyen los curcuminoides, con efectos medicinales. La curcumina (diferuloylmethane), posee tanto propiedades anti-inflamatorias como antioxidantes (Surh, 2002). La curcumina inhibe eficazmente la proliferación de las células humanas HT-29 y HCT-15 de cáncer de colon (Hanif y cols., 1997) impidiendo la transcripción de diversos factores claves en la inflamación, supervivencia celular y la angiogénesis, y entre los cuales se incluye en factor NFκB y la catenina (Shishodia y cols., 2007). Asimismo, la curcumina regula la sobreexpresión de COX-2 e inhibe los niveles y expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF (Cho y cols., 2007; Hanai y Sugimoto, 2009). De forma similar, han sido publicados diversos estudios en los que se pone de manifiesto los efectos quimiopreventivos de la curcumina sobre la inflamación de colon (Plummer y cols., 1999; Holt y cols., 2005; Taylor y Leonard, 2011). Resultados prometedores han sido descritos en estudios piloto llevados a

cabo en humanos, sugiriéndose que dada su buen perfil de seguridad y bajo coste, la curcumina podría ser una opción atractiva alternativa para los pacientes con EII.

### **Zumo de Piña (Bromelina)**

La bromelina es una enzima digestiva de naturaleza proteica, que nos aporta una gran cantidad de efectos medicinales. Se ha sugerido que podría resultar una buena alternativa como antiinflamatorio, para la reducción del dolor y como ayuda para las digestiones al disminuir la producción de citocinas y leucocitos durante el proceso inflamatorio. Varias enfermedades inflamatorias han demostrado beneficiarse del alto contenido en bromelina en las piñas. En particular, ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en el tratamiento de la osteoartritis y los síntomas de la artritis reumatoide, además de la EII (Hale y cols, 2005).

### **Té verde**

Es sabido que el té, la bebida más popular en el mundo, posee efectos antiinflamatorios y anticancerígenos (Yang y cols 2002, Wheeler y cols 2004). Concretamente, los polifenoles del té, también conocidos como catequinas del té, son los que median dichos efectos. Entre ellos, uno de los principales polifenoles presentes en el té verde es el galato-3 de epigallocatequina-3 (EGCG), que exhibe importantes propiedades antioxidantes y cuyo efecto antiinflamatorio está mediado por la inhibición de la vía de señalización del NFkB (Yang y cols 2001, Na y cols 2006).

### **Granada**

*Punica granatum*, conocida comúnmente como la granada, ha sido empleada en la medicina tradicional en numerosos países dado sus numerosos efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea, disentería, úlcera cólico, infección del tracto urinario, y de la sífilis.

Diversos estudios *in vivo e in vitro* han demostrado sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticancerígenas. Concretamente, se ha descrito cómo la granada proporciona protección contra la fibrosis hepática, cáncer de próstata, lesión hipóxico-isquémica inducida por pigmentación ultravioleta, reacciones alérgicas, y en la artritis reumatoide (Shukla y cols 2008, Ksai y cols 2006).

Diferentes preparaciones de la granada, incluyendo extractos de cáscaras, flores, semillas y jugo, muestran una marcada actividad anti-inflamatoria en el intestino. De forma similar, el aceite derivado de sus semillas y su principal componente ácido punícico, inhibe la expresión de citocinas pro-inflamatorias a través de la

modulación de PPAR- $\gamma$  y  $\delta$ , mientras que los extractos de cáscara de la granada, y sus compuestos puros punicalagina y ácido elágico, inhiben la expresión y secreción de varios mediadores inflamatorios. (Aviram y cols 2008, Yoshimura 2005). Recientes estudios *in vivo* han demostrado los efectos beneficiosos del tratamiento con ácido elágico así como la suplementación dietética del extracto de granada en el tratamiento de la CU inducida por TNBS o DSS en ratas (Ogawa y cols 2006, Rosillo y cols., 2011; Rosillo y cols., 2012). Resultados similares han sido descritos en estudios llevados a cabo con fracciones bioactivas y metabolitos de la granada y sugieren un efecto protector contra la colitis ulcerosa (Singh y cols, 2009, Larrosa y cols 2010)

### **Rutina**

La rutina (quercetina-3-rutinósido) es un flavonoide polifenólico que se encuentra en cítricos, té, y semillas de trigo sarraceno (Kampkoter y cols 2007, Kwon y cols 2005) Diversos autores han descrito sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias en diferentes modelos experimentales murinos. Tales efectos beneficiosos se han visto mediados por la supresión de la citocinas proinflamatorias e inhibición del TNF y de la vía de señalización celular del NF-KB, así como una reducción del estrés oxidativo en diversos modelos experimentales de CU y carcinogénesis colorrectal (Kwon y cols 2005, Kim y cols 2005, Cruz y cols 1998)

### **Ácidos grasos Omega 3**

Los ácidos grasos Omega-3 que se encuentran en peces grasos como el salmón, la caballa, el arenque y las sardinas, así como en nueces y algunos vegetales verdes, ejercen un efecto antiinflamatorio. Entre los distintos efectos beneficiosos para la salud que proporcionan, se ha sugerido que ayudan a aliviar el dolor e inflamación intestinal que acompaña a la EC y CU. No obstante, también han sido publicados resultados contradictorios.

### **Aceite de Oliva**

Una de las características más importantes de la dieta mediterránea es el uso del aceite de oliva (AO) como principal fuente de grasa. En el mercado nos encontramos con diferentes tipos de AO que se clasifican según unos determinados parámetros de calidad: acidez, índice de peróxidos, absorbancia en el ultravioleta, características organolépticas y contenidos en ceras.

Dentro de esta clasificación, cabe destacar el aceite de oliva virgen extra (AOVE) el cual se caracteriza por la presencia de una serie de compuestos de naturaleza fenólica, entre los que se encuentran los flavonoides o los alcoholes fenólicos como el tirosol o el hidroxitirosol, y cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo 0.8%. Está constituido por una fracción saponificable, lo que supone más del 98% del aceite y por una fracción insaponificable (FI) que comprende un 1.5%-2%.

Recientes estudios epidemiológicos han confirmado que el AOVE induce múltiples efectos beneficios, entre ellos efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antiapoptóticos, lo que nos lleva a considerarlo como un alimento funcional de primera línea. Dentro del contexto de la dieta mediterránea, el AOVE puede ser eficaz en la prevención y tratamiento de ciertas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, la inflamación y el sistema inmune, en particular, enfermedades cardiovasculares, digestivas y diversos tipos de cáncer (Alarcon de la Lastra y cols 2001, Alarcon de la Lastra y cols 2002 y Perez-Jimenez 2005) . En relación a los componentes polifenólicos del AOVE, entre los cuales se incluyen el hidroxitirosol, el tirosol o la oleuropeina, éstos han demostrado tener actividad inmunomoduladora, antiinflamatoria y antioxidante. En esta línea de actuación, se ha puesto de manifiesto utilizando modelos experimentales *in vivo e in vitro* de EII y cáncer colorrectal un importante efecto beneficioso de dietas enriquecidas con AOVE y de algunos de sus componentes bioactivos en la prevención y tratamiento de estas patologías digestivas [Cárdeno y cols., 2014; Cárdeno y cols., 2013a; Cárdeno y cols., 2013b; Sánchez-Fidalgo y cols., 2012; Sánchez-Fidalgo y cols., 2013a y 2013b; Sánchez-Fidalgo y cols., 2010; De la Lastra, C.A. e I. Villegas, 2007).



## **BLOQUE I: ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER**

---





## **CAPITULO I: ISOLATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF D\_PINITOL IN THE GENUS RETAMA**



## ESTUDIO FITOQUIMICO DE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER

Nuria H. González-Mauraza<sup>a</sup>, Antonio J. León-González<sup>a</sup>, José L. Espartero<sup>b</sup>, Juan B. Gallego- Fernández<sup>c</sup>, Marina Sánchez-Hidalgo<sup>a</sup>, Carmen Martín-Cordero<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España

<sup>c</sup>Departamento of Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, España

carmenmc@us.es

## Resumen

El género *Retama* está representado por dos especies abundantes, *R. sphaerocarpa* y *R. monosperma*. En Andalucía, la especie *R. monosperma* se desarrolla y multiplica en un entorno ecológico muy especial, creciendo en zonas arenosas rodeadas por entrantes de marea. El objetivo del presente trabajo, fue el estudio fitoquímico de la especie *R. monosperma*. *R. monosperma* fue recolectada en la flecha litoral de Nueva Umbría. Se procedió a la preparación de varios extractos de dicha especie, entre ellos el hexánico y el marco de éste. A continuación, el marco fue sometido nuevamente a una extracción y se obtuvieron los correspondientes extractos de diclorometano, acetato de etilo y butanólico. Concretamente, el extracto butanólico fue estudiado por cromatografía en capa fina (CCF) para la posterior separación de sus componentes por cromatografía sólido-líquido en columna de silicagel. Finalmente, del extracto butanólico se aislaron por técnicas cromatográficas e identificaron por diferentes métodos espectroscópicos un C-heterósido de flavona (apigenina) y por primera vez, un derivado metilado del inositol (pinitol).

**Palabras clave:** *Retama monosperma*, pinitol, apigenina, cromatografía, flavonoides

## I. INTRODUCCION

En Andalucía el género *Retama* está representado por dos especies abundantes, *R. sphaerocarpa* y *R. monosperma*. *Retama sphaerocarpa* ha sido objeto de estudio, en ella hemos aislado e identificado alcaloides quinolizidínicos (Martín-Cordero, 1991, 1993) y flavonoides (Martín-Cordero, 1999, 2000). En la presente memoria nos proponemos el estudio fitoquímico de la especie *R. monosperma* recolectada en la flecha litoral de Nueva Umbría, donde la especie se desarrolla y multiplica en un entorno ecológico muy especial, creciendo en zonas arenosas rodeadas por entrantes de marea, en estas condiciones la especie se encuentra sometido a un estrés hídrico y salino. En esta especie se han identificado por cromatografía en capa fina (CCF) los siguientes flavonoides: daidzeina, genisteina, 5-metilgenisteina (Harborne, 1969). Los alcaloides identificados son tipo quinolizidínico: esparteína, oxoesparteína, anagirina, cistina, metilcistina, pachicarpina, retamina y esferocarpina.

Las isoflavonas son unos flavonoides con una estructura derivada de la 3-fenil-benzopirán -4-ona. Al igual que las flavonas presentan un encadenamiento Ar-C3-Ar, pero se diferencian de estas en que es de tipo 1,2 difenil -propano en vez de 1,3-difenil propano (López Luengo, 2002)

Las isoflavonas aparecen sobre todo en especies de la familia Fabaceae, como son la soja (*Glycine max*) o trébol rojo (*Trifolium platense*).

Las principales isoflavonas aisladas de estas especies vegetales son la genisteina, daidzeina y la gliciteína, y sus derivados glucosilados y metoxilados.

Algunas isoflavonas, junto con algunos lignanos, cumestranos y derivados de resorcinol, forman parte de los fitoestrógenos, que son aquellos compuestos de naturaleza no esteroidea que presentan una actividad antagonista estrogénica debida a su interacción con los receptores 17- $\beta$ -estradiol.

Aunque los efectos de las isoflavonas no son potentes, las concentraciones alcanzadas en el organismo son lo suficientemente altas como para poder producir sus efectos fisiológicos.

Las isoflavonas están indicadas en:

-*Síntomas climaterios*: Debido al débil efecto estrogénico de las isoflavonas, éstas pueden antagonizar los síntomas de hipoposterismo, asociados a receptores beta como los sofocos, sudores nocturnos, osteoporosis, mientras que no afecta a otros como es la atrofia uterina, asociada a receptores alfa. Tampoco parecen tener efecto sobre la depresión, ansiedad e insomnio asociados a la menopausia. (Nagata, 2000)

-*Osteoporosis postmenopáusica*. Se ha comprobado en estudios animales y humanos que las isoflavonas aumentan la densidad ósea. Los efectos parecen ser debidos, a un aumento en la producción de hueso y no a una disminución en la resorción ósea.

Las isoflavonas han demostrado ser efectivas sólo como preventivas, no pudiendo revertir una osteopenia ya establecida.

Los fitoestrógenos han demostrado tener un efecto protector sobre el sistema cardiovascular, disminuyendo el riesgo a padecer una arteriosclerosis en mujeres postmenopáusicas. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción, parece ser debido a dos posibles efectos:

-*Efecto hipolipemiante*. Las isoflavonas mejoran el perfil lipídico por sus efectos estrogénicos y sobre el balance de los ácidos biliares. Además parece que aumentan los receptores LDL. En estudios sobre animales las isoflavonas de la soja producen una mejora en los niveles de HDL y LDL y una disminución en el riesgo de aterosclerosis. (Goodman-Gruen, 2001)

-*Efecto antioxidante*. Las isoflavonas presentan, como todos los compuestos fenólicos, un efecto antioxidante. Por tanto protegen de la oxidación a las LDL e impiden la aparición de células espumosas. En ensayos *in vitro*, se ha visto que las isoflavonas se incorporan a las LDL e inhiben la oxidación mediada por cobre de las mismas.

Asimismo, las isoflavonas son inhibidoras de multitud de enzimas, entre las que destacan:

-*Tirosina-cinasa*. La inhibición de esta enzima desencadena dos importantes procesos como son la inhibición de la expresión de ciertos oncogenes y la disminución de receptores para algunos factores de proliferación celular (factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulínico, factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento tumoral).

-*Topoisomerasa II*. Las isoflavonas forman un complejo ternario con el complejo DNA-topoisomerasa II, induciendo la apoptosis de células cancerígenas.

-*Aromatasa*. Las isoflavonas impiden la formación del 17- $\beta$ -estradiol a partir de la testosterona, actuando en aquellos tumores dependientes de hormonas, como el cáncer de mama. (Nakagawa, 2000)

También presentan *acción vasodilatadora* y *acción antiagregante plaquetaria*. Las isoflavonas reducen los niveles de calcio libre en el interior de la fibra de músculo liso por una disminución de su entrada desde el exterior y un aumento de la recaptación por el retículo sarcoplasmático. Además estimulan el óxido nítrico sintasa, aumentando los niveles de *óxido nítrico* (NO). Estos efectos se sinergizan para lograr el efecto vasodilatador.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II. 1. MUESTRA

Las muestras constituidas por la sumidad fructificada de *Retama monosperma* (L.) Boissier, fueron recogidas en el mes de septiembre, en la flecha litoral de Nueva Umbría (Huelva). Las muestras fueron identificadas y recolectadas por el Dr. Juan B. Gallego Fernández.

### II. 2. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Para obtener los extractos sometimos a la droga seca y troceada (395.6 g.) a extracción en soxhlet con hexano, obteniéndose el correspondiente extracto hexánico (Fig. 1);

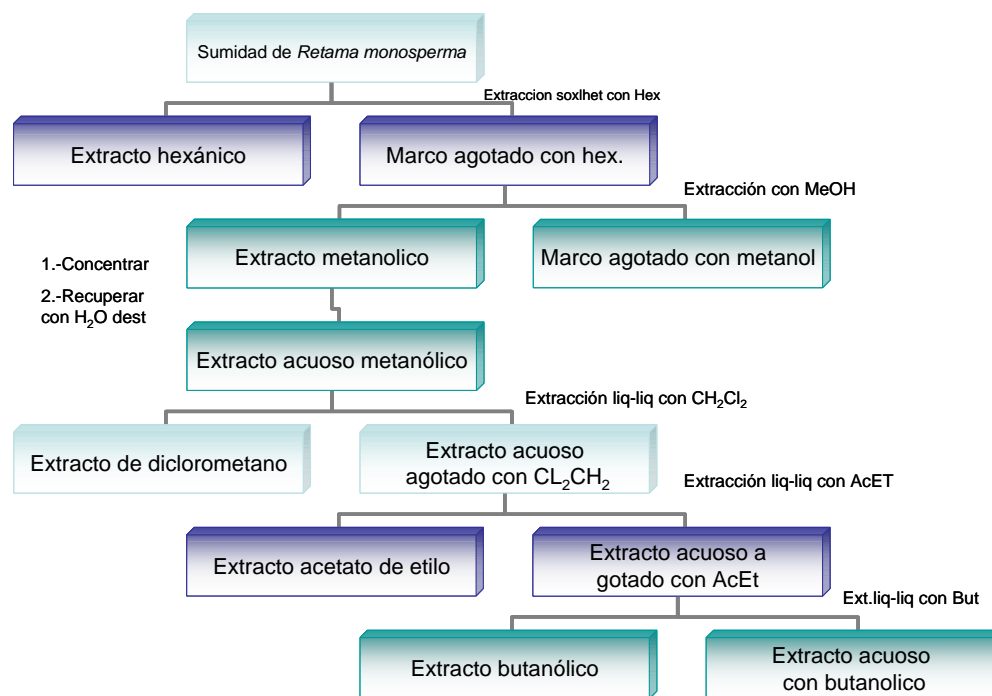


Figura 1. Esquema del proceso extractivo

El marco resultante se trató por el mismo proceso con metanol. El marco se concentró en rotavapor hasta un volumen pequeño y se recuperó con agua. A continuación, mediante extracción líquido-líquido, el extracto acuoso se agotó con cloroformo y, posteriormente con acetato de etilo y butanol obteniéndose los correspondientes extractos.

### II. 3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

#### CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

##### Material:

- Cubetas cromatográficas de vidrio (Desaga)
- Lámpara de luz U.V. a 254nm y 365nm (Spectoline, model CM-10)
- Placa calefactora
- Pulverizador de aire a presión
- Capilares de vidrio

#### Fases estacionarias

- Silicagel 60 F254 (cromatofolios, Merk)

#### Fases móviles

- Diclorometano: Metanol (90:10; 98:2; 99:1; 95:5; 80:20; 9.9:0.1)
- Hexano: Acetato de etilo (99:1; 95:5; 90:10; 80:20; 70:30; 50:50)
- Acetato de etilo: Metanol: Agua (80:10:10; 80:5:5)

#### Reveladores

- Luz U.V. (254 y 365nm) .Detecta compuesto flavonoides, clorofilas.
- Óleum: ácido sulfúrico/ácido acético glacial/agua (2:40:8).Exposición a 120°C durante 5 minutos. Detecta compuestos orgánicos, es un reactivo general.
- Tricloruro de aluminio al 2% en etanol. Observación visible y U.V.Detecta Flavonoides (Krebs *et al*, 1969).

### **CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (CC):**

#### **Cromatografía sólido-líquido de absorción en sílice**

##### Material

- Columna de vidrio de 45 cm de longitud y 2 cm de diámetro.
- Rotavapor
- Tubos de ensayo de vidrio
- Papel de plata
- Gradillas
- Reservorio de vidrio
- Embudos
- Matraz Erlenmeyer

##### Fase estacionaria

- Silicagel 60 (0.063-0.2 mm)

##### Fase móvil

- Hexano: acetato de etilo (8:2; 7:3; 1:1)

## **II. 4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES**

### **ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA (UV)**

La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopia de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas

Material:

- Espectrofotómetro Lambda 3 Perkin-Elmer
- Registrador (mod Perkin-Elmer 561)
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y 3 ml de capacidad.

Reactivo: Metanol

### **ESPECTROSCOPIA DE INFRAROJO (IR)**

La radiación infrarroja, radiación térmica o radiación IR es un tipo de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la luz visible, pero menor que la de las microondas. Consecuentemente, tiene menor frecuencia que la luz visible y mayor que las microondas. Su rango de longitudes de onda va desde unos 700 nanómetros hasta 1 milímetro. La radiación infrarroja es emitida por cualquier cuerpo cuya temperatura sea mayor que 0 Kelvin, es decir, -273 grados Celsius (cero absoluto). Se ha utilizado un espectrofotómetro de infrarrojos (IR), Jasco FT/IR-410 de transformada de Fourier.

### **ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)**

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopia de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación.

Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son un imán, actualmente una bobina superconductora, que suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro.

Se ha utilizado un espectrofotómetro de resonancia magnética nuclear (RMN), Bruker Avance-500, operando a 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125,75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) con las señales residuales del disolvente (2,49 ppm para  $^1\text{H}$  y 39,5 ppm para  $^{13}\text{C}$ ) como referencias. Se ha utilizado dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- $d_6$ ) como disolvente y los espectros se han registrado a 303K. Se han obtenido espectros monodimensionales ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), así como bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) para la asignación de las señales observadas.

### **ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)**

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z)

Se ha utilizado un espectrómetro de masas Micromass AUTOSPECQ, con ionización por impacto electrónico (IE).

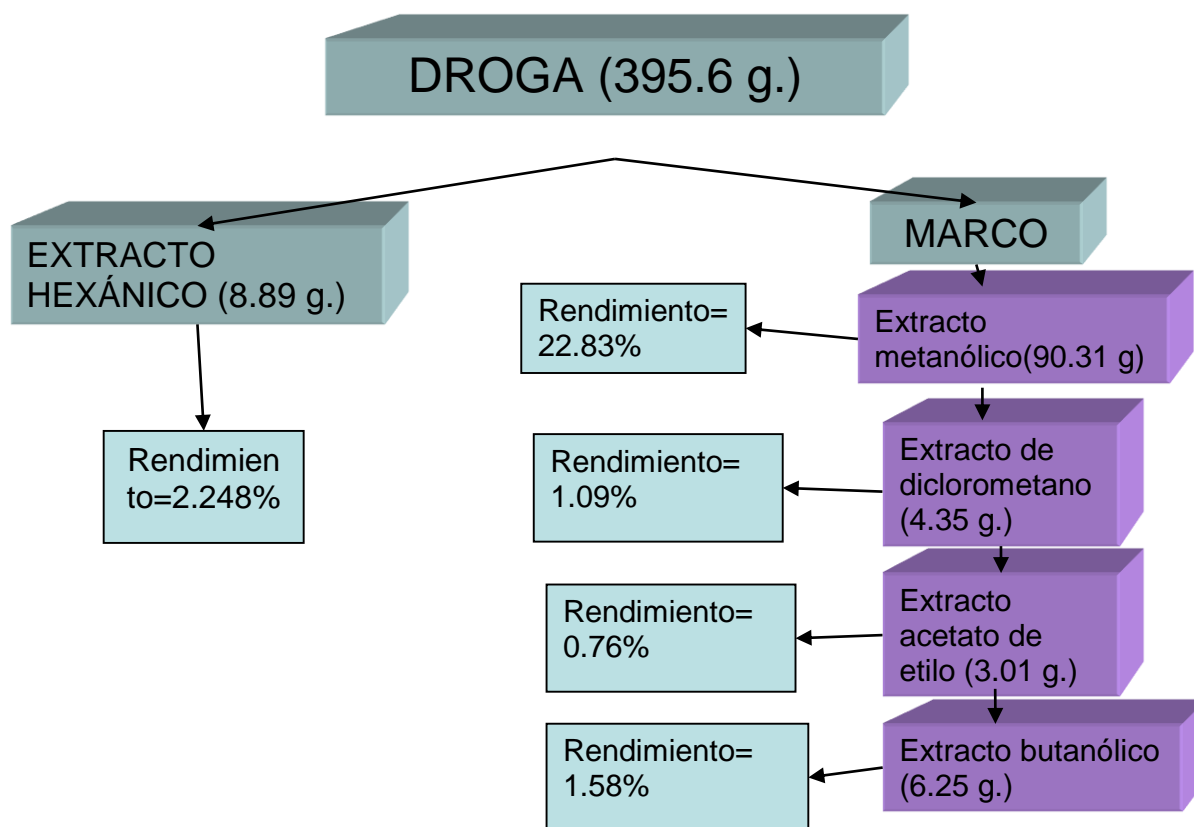
### **III. RESULTADOS**

#### **III.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS**

Seleccionado el método de extracción con Soxhlet que es una destilación con calor y continua, durante 48 horas destilamos la sumidad de *Retama* con hexano y obtuvimos el extracto hexánico y el marco.

A este marco fue sometido nuevamente a extracción le realizamos una extracción durante 48 horas y obtuvimos el extracto metanólico seguidamente realizamos una extracción liquido-liquido con diclorometano, acetato de etilo y butanol. Obteniendo los correspondientes extractos de diclorometano, acetato de etilo y butanólico





**Figura 2. Esquema del rendimiento de los extractos**

### III. 2. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO.

El extracto butanólico fue estudiado por cromatografía en capa fina (CCF) para la posterior separación de sus componentes por cromatografía sólido-líquido en columna de silicagel.

Partimos de 6.25 gramos de extracto butanólico del cual pesamos 2,5 gramos de este extracto y fue mezclado con silicagel 0.2-0.5 mm, formando una cabeza que se montó en una columna de vidrio de 2 x 40 cm, necesitando 70 gramos de sílice (0.063-0.2 mm) para lograr una altura de 20 cm.

Los eluyentes utilizados fueron acetato de etilo/metanol/agua (80:0.5:0.5, 80 1:1, 80:3:3, 80:5:5).

Se recogieron 360 fracciones de de aproximadamente 10 ml cada una, que se agruparon de acuerdo a su comportamiento en CCF (Tabla 1)

El revelado se realizó con UV, solución de  $\text{AlCl}_3$  y óleum.

Tabla 1

FRACCION	ELUYENTE AcEt/MeOH/H <sub>2</sub> O	OBSERVACIONES
1-15	80:0.5:0.5	mezclas
16-20	80:0.5:0.5	mezclas
21-25	80:0.5:0.5	<b>Hb1</b>
26-30	80:0.5:0.5	mezclas
31-35	80:0.5:0.5	mezclas
36-69	80:0.5:0.5	mezclas
70-95	80:0.5:0.5	mezclas
96-135	80:1:1	<b>Hb2</b>
136-178	80:1:1	mezclas
179-189	80:1:1	mezclas
190-260	80:3:3	<b>Hb3 + Hb4</b>
261-284	80:3:3	mezclas
285-360	80:5:5	mezclas

De las fracciones 21-25 se obtuvo un compuesto y le llamamos Hb1.

De las fracciones 96-135 se obtuvo un compuesto de color blanco en gran cantidad que denominamos Hb2.

Las fracciones 190-260 obtuvimos dos compuestos, Hb3 y Hb4 en pequeña cantidad y para purificarlos realizamos una cromatografía en capa fina preparativa, obteniendo Hb3 de color blanco y Hb4 de color amarillo.

De las fracciones 21-25, se obtuvo un compuesto que denominamos **Hb1**, confirmada su pureza por cromatografía en capa fina (CCF). Se identificó parcialmente por métodos espectroscópicos (UV, EM). Ultravioleta:  $\lambda$  máx. (nm), MeOH: 270, 324 (Fig.3)

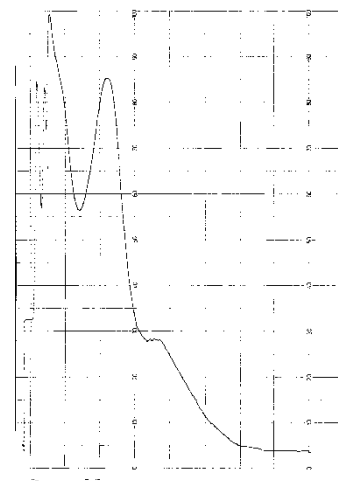
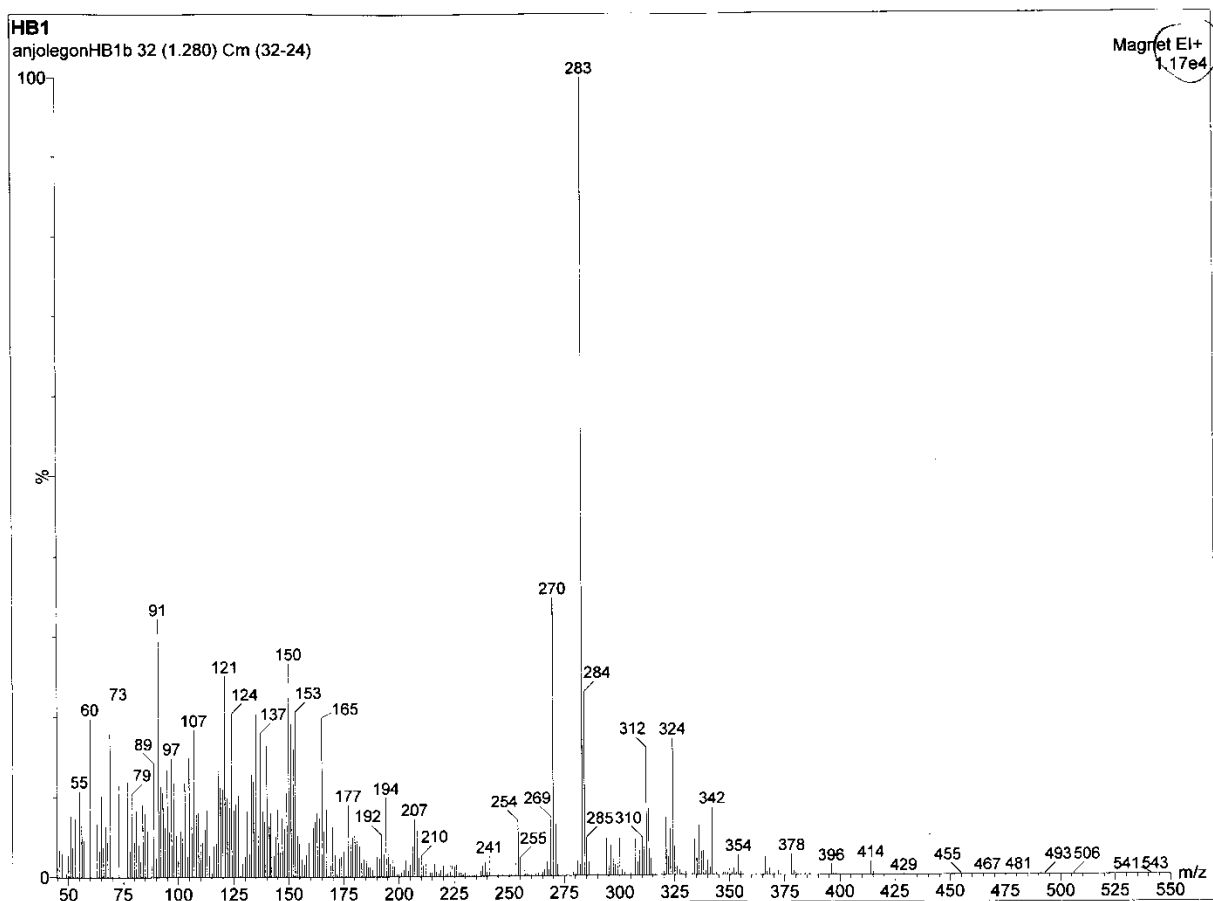


Figura 3. Espectro de U.V

Espectro de masa, m/z (%): 55, 60, 91, 121, 137, 150, 165, 177, 270 (50%), 283 (100%), 312, 324, 342, 342, 378, 396, 414.



**Figura 4**  
Espectro de masas (IE)

De las fracciones 96-135, se obtuvo un compuesto que denominamos Hb2, confirmada su pureza por cromatografía en capa fina (CCF). Se identificó por métodos espectroscópicos (RMN, EM, IR).

Pinitol in the genus *Retama*

Natural Product Communications Vol. 10 (0) 2015 68

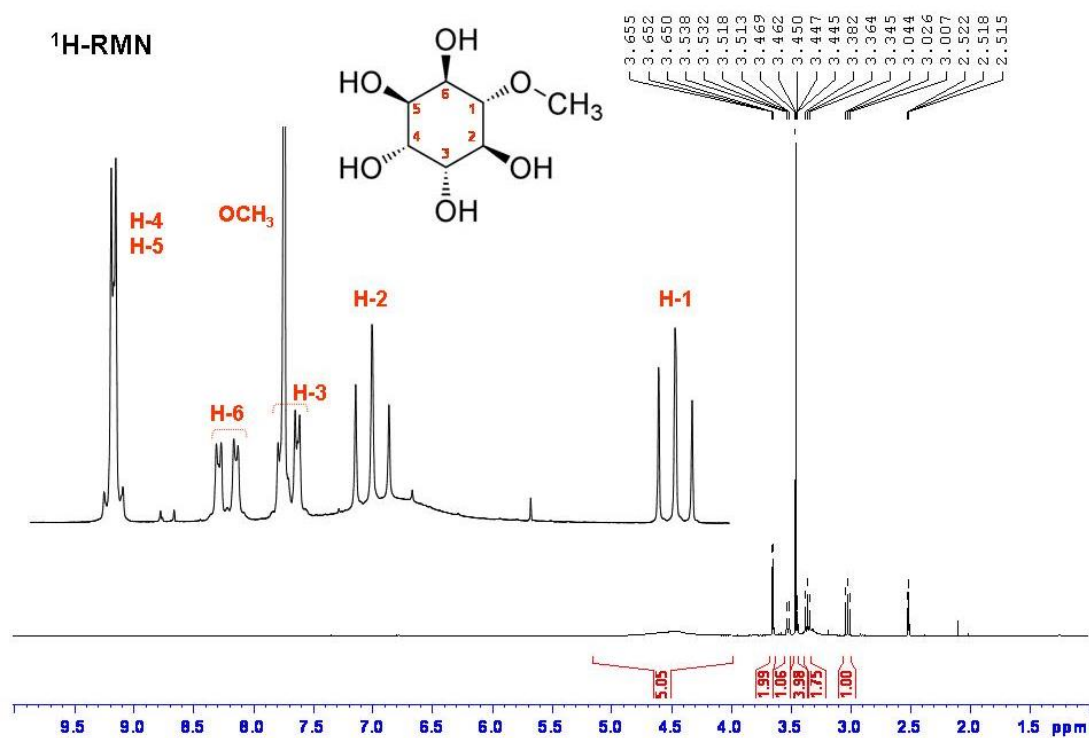
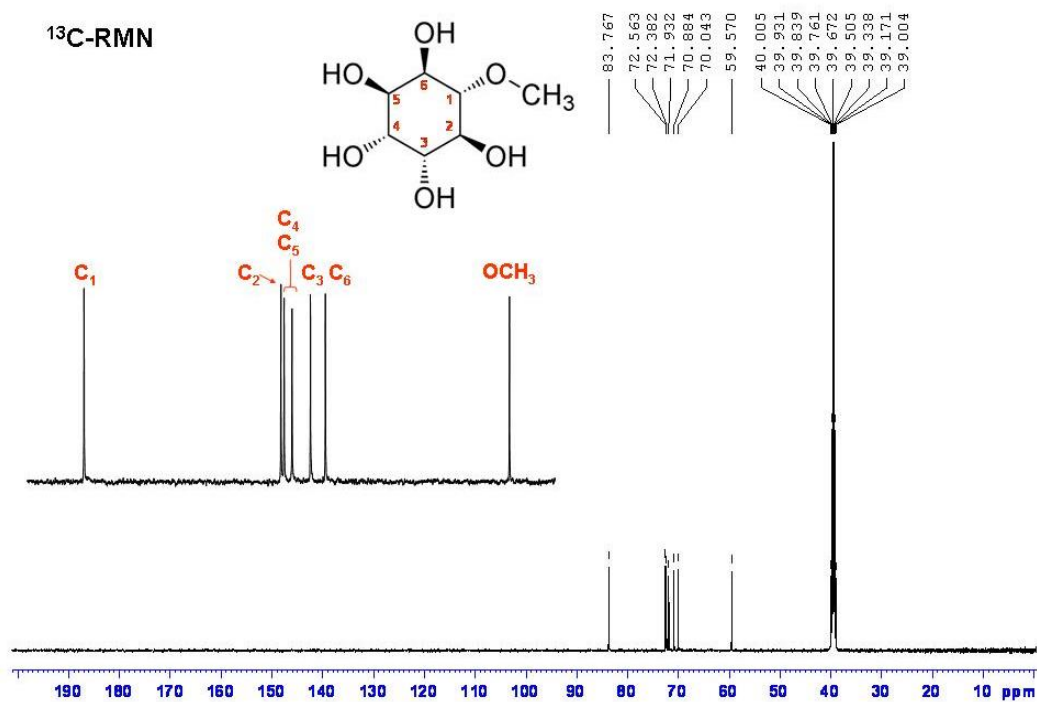


Figura 5

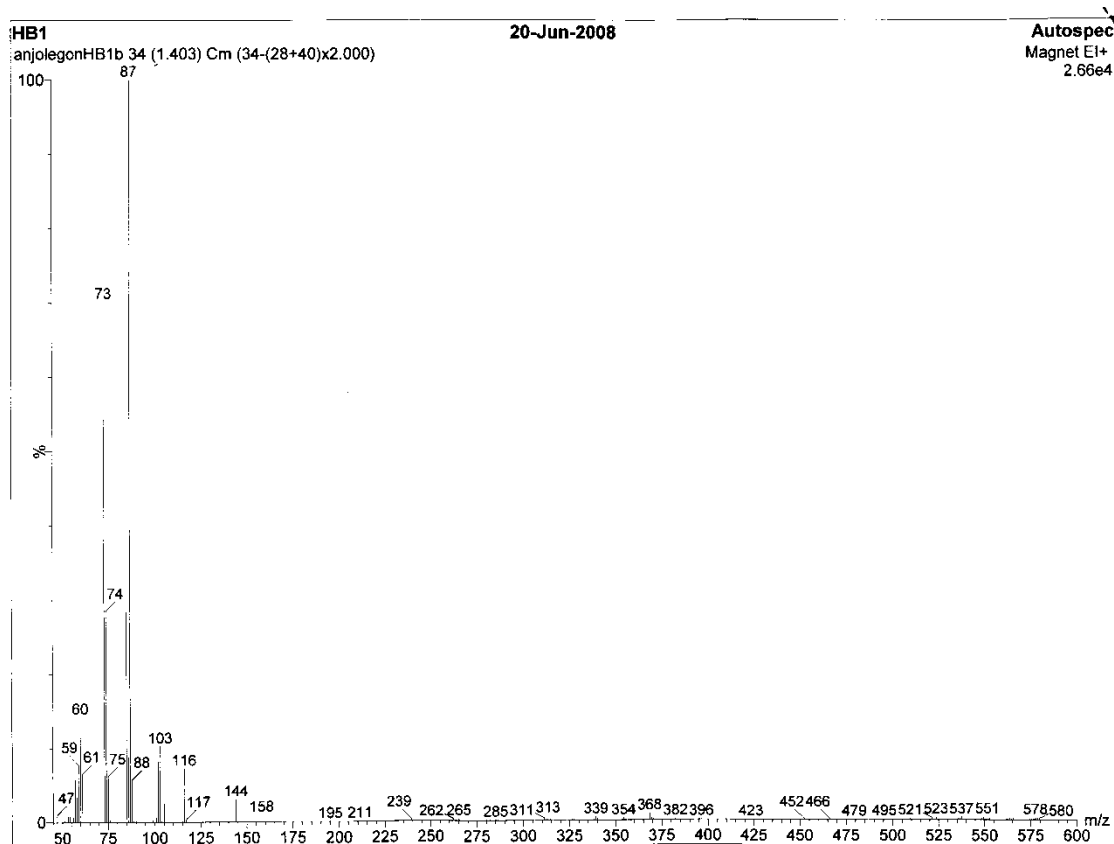
Espectro de <sup>1</sup>H-RMN

Pinitol in the genus *Retama*Natural Product Communications Vol. 10 (0) 2015 **69**

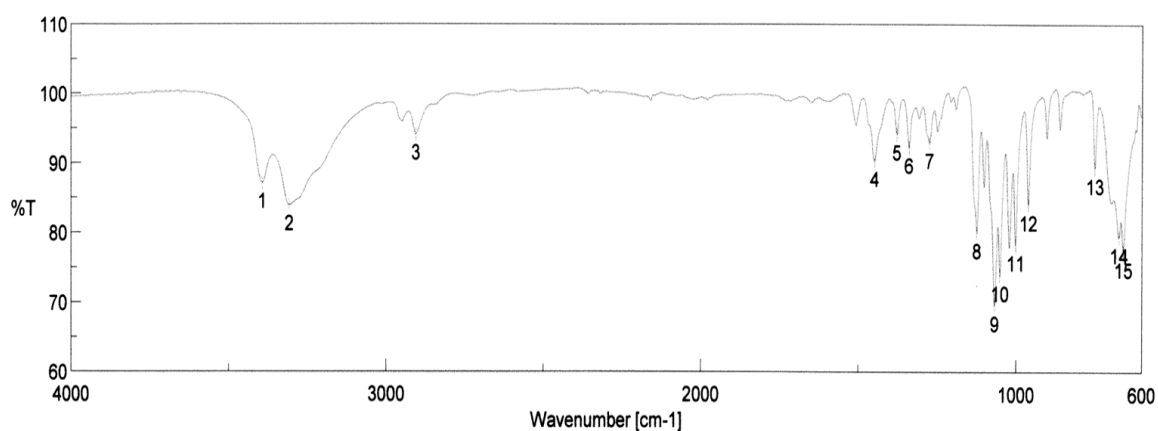
**Figura 6**  
Espectro de <sup>13</sup>C-RMN

Pinitol in the genus *Retama*

Natural Product Communications Vol. 10 (0) 2015 70



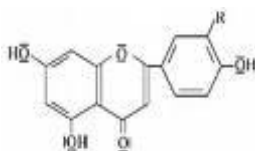
**Figura 7**  
Espectro de masas (IE)



**Figura 8**  
Espectro de IR

#### IV. DISCUSIÓN

El espectro ultravioleta del compuesto **Hb1** (Fig.3) presenta máximos de absorción a longitud de onda características de una flavona y el espectro de masas (Fig.4) de impacto electrónico muestra un ión molecular a 270 que corresponde al peso molecular de la genina apigenina.



**Apigenina**

Por otra parte, el compuesto **Hb2** se ha podido identificar como pinitol, derivado O-metilado del inositol. Para determinar su estructura han resultado determinantes los datos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), tanto de protón ( $^1\text{H}$ ) como de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ). Se han llevado a cabo experimentos de RMN-2D (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) que han permitido la asignación completa de todas las señales observadas en dichos espectros y que se encuentran recogidas en la Tabla 2.

**Tabla 2**

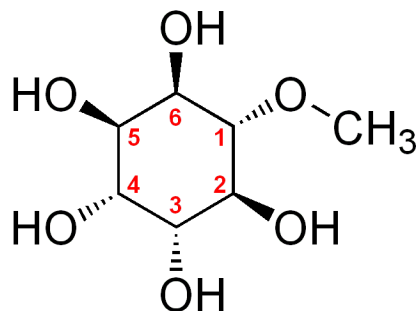
Datos de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) para el pinitol presente en la fracción Hb2. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. La multiplicidad se recoge entre paréntesis en forma abreviada:

(s), singulete; (t),

Triplete; (m), multiplete; (dd), doble doblete

Posición	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	3,00 (t) $J = 9,4$	83,77
2	3,34 (t) $J = 9,4$	72,56
3	3,43 (dd) $J = 9,4$ $J = 2,5$	70,88
4	3,62 (m)	72,38*
5	3,62 (m)	71,93*
6	3,50 (dd) $J = 9,4$ $J = 2,5$	70,04
OMe	3,43 (s)	59,57

(\*) Los valores pueden estar intercambiados.



Pinitol

## V. CONCLUSION

El extracto butanólico obtenido de la sumidad fructificada de *Retama monosperma* destaca por su riqueza en flavonoides y en polialcoholes cíclicos. Han sido aislados por técnicas cromatográficas e identificados por diferentes métodos espectroscópicos un C-heterosido de flavona (apigenina) y un derivado metilado del inositol (pinitol).

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Bonilla C.A, M.D. Isoflavoans en ginecología, terapia no convencional. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.55, 209-217,2004
- Cavín A, Hostettman K, Dyatmyknow W, Potterat O, Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. Planta Med.64,393-396, 1998.
- Douglas E. Dorman, S.J. Angyal, and John D. Roberts. Nuclear Spectroscopy. Carbon-13 Spectra of Some Inositols and Their O-Methylated Dereivatives. J. Am. Chem. Soc.11, 1351-1354,1970.
- El-Shalzy A, Ateya AM, Witte L, and Wink M. Quinolizidine Alkaloid Profiles of *Retama raetam*, *R.Sphaerocarpa* and *R. monosperma*. Z.Naturforsch. 51,301-308,1996.
- Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D. Usually dietary isofalvone intake is associates with cardiovascular disease risk factors in posmenoapusal womwn.J Nutr.131,1202-1212, 2001.
- Harborne J.B.. Chemosystematics of the leguminosae.Flavonoid and isoflavonoid patters in the tribe genisteae. Phytochemistry.8, 1449-1456,1969.



Hanson L., Engelman H.M., D. Lee Alekel, Schalinske K.L., Kout M.L., and Reddy M.B Effects of soy isoflavones and phytate on homocysteine, C-reactive protein, and iron status in menopausal women. *Am J Clin Nutr.* 84, 774-80, 2006.

Krebs K.G., Heusser D., Wimmer H., Sprey Teagents. In Sthal E (Ed) *Thin-layer chromatography*. Berlín, Springer-verlag. 854-909, 1969.

López Luengo M<sup>a</sup>. Flavonoides. *Ambito farmacéutico. Fitoterapia.* 21, 108-113, 2002

Martín-Cordero, C., Gil Serrano, A.M., Ayuso González, M.J. Variations des alcaloides de *Retama sphaerocarpa* Boiss. *Plantes méd. et phytothèr.* 25, 2-3, 1991

Martín-Cordero, C., Gil Serrano A.M., Ayuso González, M.J. Transfer of bipiperidil and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* (Loranthaceae) hemiparasitic on shrub of *Retama sphaerocarpa*. *J. Chem. Ecol.* 19, 2389-2393, 1993

Martín-Cordero, C., López, M., Gil-Serrano, A., Rodríguez Carvajal, M.A.; Ayuso, M.J. Novel Flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry* 8, 1129-1131, 1999.

Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Espartero, J.L., Ayuso M.J. Retaminotrioside, a New Flavonol Triglycoside from *Retama sphaerocarpa*. *J. Nat. Prod.* 63, 248-250, 2000.

Medeiros P.M., Benrd R.T. Simoneit. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography –mass spectrometry. *J. of Chromatography A.* 1141, 271-278, 2007.

Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N. Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results a community-based prospective study. *Am J. Epidemiol.* 153, 709-713, 2001.

Navarro C., Beltrán E. Fitoestrógenos: Posibilidades terapéuticas. *Revista de fitoterapia* . 1, 80-165, 2000.

Rios DR, Rodrigues ET, Cardoso AP, Montes MB, Franceschini SA, and Tolo MR. Effects of isoflavones on the coagulation and fibrinolytic system of postmenopausal women. 24, 120-126, 2008

Schiliemann W, Ammer C, Strack D. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry.* 2008; 69:112-146

Stephen J. Angyal, Leon Odier. The effect of o-methylation on chemical shifts in the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-N.M.R. Spectral of cyclic polyols. *Carbohydrate Research* . 123, 23-29, 1993.

Sridhar C., Krishnaraju A.V, and Subbaraju G.V . Antiinflammatory constituents of *Teramnus labialis*. *Indian J. Pharm. sci.* 68, 111-114, 2006.

Valdés B., Talavera S., Fernández-Galiano E. Flora vascular de Andalucía occidental. 2, 162, 1987.

Wiseman H, O'Reilly J.D., Adlercreutz H. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J. Clin Nutr.* 72, 395-400, 2000.

NPC

Natural Product Communications

2015  
Vol. 10  
No. 0  
1 - 2**Pinitol, an active principle in *Retama* spp.**Nuria H. González-Mauraza<sup>a</sup>, Antonio J. León-González<sup>a</sup>, José L. Espartero<sup>b</sup>, Juan B. Gallego-Fernández<sup>c</sup>, Marina Sánchez-Hidalgo<sup>a</sup>, Carmen Martín-Cordero<sup>a\*</sup><sup>a</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain<sup>b</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain<sup>c</sup>Department of Plant Biology and Ecology, University of Seville, Spain

carmenmc@us.es

Received: August XX, 2015; Accepted: XX, 2015

The genus *Retama* (Fabaceae) is widely distributed in the Mediterranean region. Aerial parts of *R. monosperma*, *R. raetam* and *R. sphaerocarpa* have been employed in traditional medicine as antidiabetic, antihypertensive and anti-rheumatic, among other uses. Pinitol (3-*O*-methyl-chiroinositol), an anti-inflammatory and antidiabetic molecule, has been isolated from aerial parts of *R. monosperma*. Its structure has been established on the basis of spectroscopic techniques (1D/2D NMR) and MS. Its identification and quantification in *R. raetam*, and *R. sphaerocarpa* was also evaluated. *R. monosperma* has the highest concentration of pinitol (2.3%). The presence of pinitol in aqueous extracts of *Retama* spp. may explain the hypoglucemic activity and the traditional use as antidiabetic of this species. Also, pinitol could be considered as a coadjuvant in the anti-inflammatory activity of *Retama* spp.

**Keywords:** *Retama*, pinitol, cyclitol, 3-*O*-methyl-chiro-inositol

Traditional medical knowledge has two potential values, one as an easily accessible and low-cost source of medicines for primary health care; and the other as the source of leading compounds for the development of new drugs [1]. Many researchers are nowadays interested in giving scientific authentication of the activity of medicinal plants used in traditional medicine around the world and they search explanation for their mechanisms of action [2].

One such group of plants that is currently used by the Mediterranean population in the treatment of different ailments, are plants belonging to the genus *Retama* (Fabaceae). This genus constitutes a monophyletic taxon, comprising four closely related endemic species of the Mediterranean Basin: *R. monosperma* (L.) Boiss., *R. raetam* (Forsk.) Webb., *R. sphaerocarpa* Boiss. and *R. dasycarpa* Coss. The similarity among the phenotypic characters of those four species makes complicated their proper taxonomical determination [3-4].

The aerial parts of *R. monosperma*, *R. raetam* and *R. sphaerocarpa* are traditionally used to prepare decoctions for the treatment of diabetes, hypertension, and rheumatism. Moreover, numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown different pharmacological activities, including hypoglycemic, antihypertensive, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, anticancer, antioxidant, hepatoprotective, diuretic and analgesic [5-17].

Phytochemical studies have shown that these species are very rich in flavonoids (isoflavones) [18-23] and alkaloids (quinolizidine and bipiperidyl) [24-25].

Continuing our research of bioactive compounds from *Retama* genus, we have isolated from *Retama monosperma* a cyclitol named pinitol, also known as 3-*O*-methyl-chiro-inositol (Figure 1) from butanolic extract by column chromatography on silica gel and identified by monodimensional (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) as well as bidimensional (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) NMR and mass spectral data.

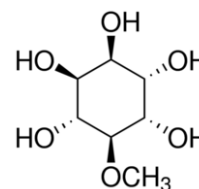


Figure 1: Structure of Pinitol

The extraction of pinitol from *Retama* spp. was performed during 1h at 70°C with water under agitation. The aqueous extracts were then filtered and lyophilized. Pinitol was quantified in three species of *Retama* genus, previous derivatization, by gas chromatography–mass

Pinitol in the genus *Retama*

spectrometry (GC-MS), expressed as percentage of dry plant weight (Table 1).

**Table 1:** Pinitol content in three species of genus *Retama*

Species	% aqueous extract	% Pinitol in aqueous extract	% Pinitol in dry plant
<i>R. monosperma</i>	14.1	16.3	2.3
<i>R. raetam</i>	20.3	8.8	1.8
<i>R. sphaerocarpa</i>	25.5	7.4	1.9

*R. monosperma* showed the highest content (2.3%) in pinitol among the three studied species, and its aqueous extract, obtained by ultrasound during one hour at 70°C, is very rich in pinitol (16.3%).

*R. monosperma*, locally known as “retama blanca” (white bridal broom), is a legume shrub mainly established on Mediterranean coastal sand and dune areas [26]. Previously, we have reported that *R. monosperma* aqueous extract exerted protective effects in an experimental murine model of Crohn’s disease. The anti-inflammatory effects were related to an impairment of neutrophil function and a down-regulation of both pro-inflammatory cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) proteins expression possibly through a p38 mitogen activated protein kinases (MAPK) and nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) signalling pathway-dependent mechanism [11]. Now, the isolation of pinitol from that aqueous extract of *R. monosperma* could be considered as a coadjuvant of his anti-inflammatory activity since pinitol inhibits the NF-κB activation pathway [27-28], which may explain its ability to suppress inflammatory cellular responses.

Also, pinitol (3-*O*-methyl-chiroinositol) has been reported to exert insulin-like effects [29-30] and to play a positive role on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus [30]. It could be an active principle of the traditional antidiabetic plant of genus *Retama*.

## Experimental

### General

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>) on a Bruker Avance 500 spectrometer operating at 500 MHz (<sup>1</sup>H) and 125 MHz (<sup>13</sup>C). Chemical shifts (δ, in ppm) were referenced to TMS, and *J* was expressed in Hz. EI-MS was taken on a Micromass Autospec (70eV) spectrometer.

### Chemicals

Methanol, ethyl acetate, trichloromethane, and *n*-butanol (*n*-BuOH) were obtained from Panreac® (Barcelona, Spain). Pyridine was purchased from AppliChem® (Barcelona, Spain). Derivatization reagents BSTFA (*N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide) and TMCS (trimethylchlorosilane) were purchased from Supelco® (Madrid, Spain). All chemicals were of analytical reagent grade.

### Plant material

Aerial parts of *R. monosperma* were collected in “El Rompido” spit (Huelva, SW Spain) on September 2010; those of *R. raetam* in Lota, Souk El Ténine (Béjaïa, Algeria) on April 2011; *R. sphaerocarpa* in Bousselam, Bouandas (Setif, Algeria), on March 2011. The plant species were identified by one of us (JBGF), and a voucher specimen

of each species was deposited in the herbarium of the University of Seville.

### Extraction and isolation of pinitol

The dried aerial parts of *R. monosperma* (395 g) were ground to a fine powder. The powder was successively extracted by a Soxhlet extractor with *n*-hexane for 24 h and with methanol (MeOH) for 48 h. The methanolic extract was evaporated to dryness (90.3 g) and suspended in 50 mL of distilled water, then it was extracted successively with trichloromethane (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-butanol (*n*-BuOH) to yield three fractions: CHCl<sub>3</sub> (4.3 g), EtOAc (3.0 g), and *n*-BuOH (6.2 g).

A portion of the *n*-BuOH extract (2.5 g) was submitted into a Silicagel column chromatography, eluted with a mixture of EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:0.5:0.5; 80:1:1; 80:3:3). A total of 284 fractions of 25 mL were collected and monitored by thin layer chromatography (TLC). Fractions from 95 to 135 were rejoined and compound **1** (110 mg, 0.07% yield) was obtained as white needles after recrystallization with acetone.

### Characterization of pinitol

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3.00 (1H, t, *J* = 9.4, H-3), 3.34 (1H, t, *J* = 9.4, H-4), 3.43 (1H, dd, *J* = 9.4, *J* = 2.5, H-5), 3.43 (3H, s, OMe), 3.50 (1H, dd, *J* = 9.4, *J* = 2.5, H-2), 3.62 (2H, m, H-1 and H-6).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>): 83.8 (C-3), 72.6 (C-4), 72.4 (C-6), 70.9 (C-5), 71.9 (C-1), 70.0 (C-2), 59.6 (OCH<sub>3</sub>).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 195 [M + H<sup>+</sup>].

### Pinitol quantification by GC/MS

Air-dried aerial parts of *R. monosperma*, *R. raetam* and *R. sphaerocarpa*, were ground to a fine powder. 100 g of powder were extracted in water under agitation during 1h at 70°C. The resulting extracts were then filtered and lyophilized. 2.5 mg/ mL solutions of the three *Retama* spp. extracts and stock solutions of standard pinitol (Sigma®) at 1, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL were prepared in distilled water. 50 µL from each of these solutions were transferred to 250 µL mini-vials and freeze-dried to obtain anhydrous conditions prior to derivatization. Standards of pinitol and samples were dissolved in a mixture of pyridine/BSTFA/TMCS (10:5:1, v/v/v, 100 µL). Silylated derivatives were injected on a gas chromatograph Agilent 6890N (Waldbronn, Germany), equipped with a polydimethylsiloxane DB-5MS capillary column (30 m x 250 µm) (Supelco®, Bellefonte, PA, USA) and a mass detector Autospec-Q.

**Acknowledgments** - The authors are grateful to the “Centro de Investigación, Tecnología e Innovación” (CITIUS) of University of Seville for the GC-MS, EI-MS and NMR analysis. AJLG is founded by a Fundación Alfonso Martin Escudero postdoctoral fellowship.

## References

- [1] Verpoorte R. (2012) Good Practice: The basis for evidence-based medicines. *Journal Ethnopharmacology*, **140**, 455-457.
- [2] Fernandes G, Banu J. (2012) Medicinal properties of plants from the genus *Cissus*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 3080-3086.
- [3] Käs E, Wink M. (1994) Phylogenetic Relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL9 and ncDNA (ITS 1 nad 2). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **8**, 65-88.
- [4] Belmokhtar Z, Kaid-Harche M. (2012) Evaluation of Genetic Diversity in Three Species of *Retama* Genus: *R. monosperma* (L) Boiss, *R. raetam* (Forssk) Webb and *R. sphaerocarpa* (L) Boiss. (Fabaceae) Based on SDS-PAGE. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **4**, 202-205.
- [5] Gushash AS. (2006) *Raa plants. Plants in the mountains of Sarat and Hejaz*, Sarawat Publishing Co, Jeddah, Saudi Arabia, 363-385.
- [6] Benitez Cruz G. (2007) *El uso de las plantas a través de la cultura tradicional Lojeña. Fundación Ibn al-Jatib de Estudios de Cooperación Cultural: Granada*, 244-245.
- [7] Said O, Khallid K, Fulder S, Azaized H. (2002) Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal Ethnopharmacology*, **83**, 251-265.
- [8] Algendaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA, Hajar AS. (2010) Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama raetam* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2448-2453.
- [9] Maghrani M, Michel JB, Eddouks M. (2005) Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytotherapy Research*, **19**, 125-128.
- [10] Eddouks M, Maghrani M, Loudec L, Haloui M, Michel JB. (2007) Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, **7**, 65-77.
- [11] González-Mauraza H, Martín-Cordero C, Alarcón-de-la-Lastra C, Rosillo MA, León-González AJ, Sánchez-Hidalgo M. (2014) Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **70**, 163-172.
- [12] Bremmer P, Rivera D, Calzado MA, Obon C. (2009) Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal Ethnopharmacology*, **127**, 295-305.
- [13] Edziri H, Mastouri M, Mahjoub MA, Mighri Z, Mahjoub A, Verschaeye L. (2012) Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers. *Molecules*, **17**, 7284-7293.
- [14] Omara EA, Nada SA, El-Toumy SA. (2009) Evaluation of hepatoprotective activity of the *Retama raetam* sedes on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Planta Medica* **75**, PH29
- [15] Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Eddouks M. (2005) Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.* **99**, 31-35.
- [16] Merghoub N, Benbacer L, El Btaouri H, Ait Benhassou H, Terryn C, Attaleb M, Madoulet C, Benjouad A, El Mzibri M, Morjani H, Amzazi S. (2011) *In vitro* antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Mol. Biol.* **57**, 1581-1591.
- [17] Djeddi S, Karioti A, Yannakopoulou E, Papadopoulos K, Chatter R, Skalta H. (2013) Analgesic and Antioxidant Activities of Algerian *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel Extracts. *Records of Natural Products*, **7**, 169-176.
- [18] López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Ayuso MJ. (1999) *Flavonoids of Retama sphaerocarpa*. *Planta Medica* **65**, 778-779.
- [19] López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Iglesias Guerra, F, Ayuso MJ. (1998) An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry* **48**, 401-402.
- [20] Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Espartero JL, Ayuso MJ. (2000) *Retamatrioside, a new flavonol triglycoside from Retama sphaerocarpa*. *Journal Natural Products* **63**, 248-250.
- [21] Kaseem M, Mosharafa SA, Saleh NA, Abdel-Wahad SM. (2000) Two new flavonoids from *Retama raetam*, *Fitoterapia*. **71**, 649-654.
- [22] Abdalla MF, Saleh NAM. (1983) Flavonoids of *Retama raetam*. *Journal of Natural Products*, **46**, 755-757.
- [23] Louaar S, Akkal S, Boussetla A, Medjroubi K, Djarri L, Seguin E. (2005) Phytochemical study of *Retama sphaerocarpa*. *Chemistry of Natural Compounds* **41**, 107-108.
- [24] El-Shazly A, Ateya AM, Witte L, Wink M. (1993) Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **51c**, 301-308.
- [25] Martín-Cordero C, Gil AM, Ayuso MJ. (1993) Transfer of bipiperidyl and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* hemiparasitic on shrub of *Retama sphaerocarpa*. *Journal Chemical Ecology* **19**, 2389-2393. [26] Muñoz Vallés, S, Gallego Fernández, JB, Cambrollé, J. (2013) The Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Journal of Coastal Research* **29**, 1101-1110.
- [27] Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal BB. (2008) Pinitol targets nuclear factor-kappa B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutic* **7** (6), 1604-1614
- [28] Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Ganesh MK, Balasubramanian MP, Nishigaki I. (2015) D-pinitol mitigates tumor growth by modulating interleukins and hormones and induces apoptosis in rat breast carcinogenesis through inhibition of NF-κB. *Journal Physiology Biochemistry* **71**(2), 191-204.
- [29] Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. (2000) Insulin-like effect of pinitol. *British Journal of Pharmacology* **130** (8), 1944-1948.
- [30] Sivakumar S, Palsamy P, Subramanian SP. (2010) Attenuation of oxidative stress and alteration of hepatic tissue ultrastructure by D-pinitol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res.* **44**(6), 668-678.

Pinitol in the genus *Retama*

*Natural Product Communications* Vol. 10 (0) 2015 **77**

- [31] Gao Y, Zhang M, Wu T, Xu M, Cai H, Zhang Z. (2015) Effects of D-Pinitol on Insulin Resistance through the PI3K/Akt Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. *Journal Agricultural Food Chemistry* **63**(26), 6019-602



## **BLOQUE II: EFECTOS DE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS EN LA INFLAMACIÓN AGUDA**

---





**CAPITULO II. R. MONOSPERMA (L.) BOISS EXTRACT  
INHIBITS LPS-INDUCED PRO-INFLAMMATORY MEDIATORS  
IN MURINE MACROPHAGES VIA SUPPRESSION OF NFkB  
ACTIVATION**

***R. monosperma* (L.) Boiss extract inhibits LPS-induced pro-inflammatory  
mediators in murine macrophages via suppression of NFκB activation**

Nuria Haidee González-Mauraza., Carmen Martín-Cordero., Marina Aparicio-Soto M.,  
Catalina Alarcón de la Lastra., Marina Sánchez-Hidalgo\*  
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville.  
Profesor García González Street 2, 41012 Seville, Spain.  
[hidalgosanz@us.es](mailto:hidalgosanz@us.es)

**Abstract**

One group of plants currently used by the Mediterranean population in the treatment of different ailments is the genus *Retama* (Fabaceae). Particularly, *R. monosperma* (L.) Boiss., locally named as “retama blanca”, is a legume shrub that establishes mainly on coastal sands and dunes in zones under a Mediterranean climate. The aerial parts of *R. monosperma* spp., which main constituents are flavonoids, have been traditionally used to prepare decoctions for the treatment of several diseases including diabetes, hypertension, and rheumatism. Emergeting in vitro and in vivo studies have reported its functional versatility related to its anti-inflammatory, antioxidant and anticancer properties. In this context, the present work was undertaken to investigate the effects and molecular actions of an aqueous *R. monosperma* extract in macrophages isolated from murine peritoneal cavity. *R. monosperma* treatment reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced protein levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) as well as nitrites production in a concentration-dependent manner, as determined by Western blotting and Griess reaction, respectively. Furthermore, *R. monosperma* inhibited the LPS-induced signalling pathway of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by a reduction in IkappaB-alpha degradation. Taken together, our data indicate that anti-inflammatory properties of *R. monosperma* might be the result from the inhibition of iNOS, COX-2 protein expression and NO production via the down-regulation of NF-kappaB pathway. Altogether, *R. monosperma* might suppose an improvement in public health on the prevention of chronic pathologies with high prevalence in the population.

**Keywords:** COX-2, inflammation, macrophages, NF-κB, NO, *Retama monosperma*

**1. Introduction**

The search of plants with anti-inflammatory activity and the subsequent identification of the compounds responsible for their effects and the unraveling action mechanisms can be successfully based on information gained through knowledge on their traditional use. This is particularly true for biodiversity-rich regions of the world such as the Mediterranean. One such group of plants currently used by the Mediterranean population in the treatment of different ailments is the genus *Retama* (Fabaceae). This genus constitutes a monophyletic taxon, comprising four closely related endemic species of the Mediterranean Basin and the Canary Islands: *R. monosperma* (L.) Boiss., *R. raetam* (Forsk.) Webb., *R. rhodorhizoides* Webb & Berthel, and *R. sphaerocarpa* Boiss (Käs &

Wink, 1994). The similarity among the phenotypic characters of those four species makes complicated their proper taxonomical determination. Particularly, *R. monosperma* (L.) Boiss., locally named as “retama blanca”, is a legume shrub that establishes mainly on coastal sands and dunes in zones under a Mediterranean climate. The aerial parts of *R. monosperma* spp., which main constituents are flavonoids, including flavonols, flavons and isoflavons as well as quinolizidine and bipiperidyl alkaloids, have been traditionally used to prepare decoctions for the treatment of several diseases including diabetes, hypertension, and rheumatism. However, only few studies have highlighted the important biological activities of *R. monosperma* (L.) Boiss., extract (RmE). Emergeting *in vitro* and *in vivo* studies have reported its functional versatility related to its anti-inflammatory (El-Toumy et al., 2011; Bremner et al., 2009), antioxidant (Belmokhtar & Harch, 2014) and anticancer properties (Belayachi et al., 2014; Merghoub et al., 2011). Within this context, the antiinflammatory beneficial effect of RmE has been ascribed to its flavonoids content in an ulcerative colitis model in rats (González-Mauraza et al., 2014). In this sense, our research group has shown that RmE was able to reduce the tissue damage and severity of the colitis, alleviating the oxidative events and returning proinflammatory protein expression to basal levels probably through p38 MAPK and NFkB signalling pathways. Nevertheless, there is still a great lack of knowledge on the biological activity of RmE.

The inflammatory process is defined as a wide variety of adaptative physiological and pathological processes which implicate a complex set of interactions among soluble factors and cells that can arise in any tissue. Macrophages (and their precursors, monocytes) play pivotal roles in inflammation and homeostasis given their ability to clear pathogens and instruct other immune cells (Moore et al., 2010). In response to injury or infection, the initial response involves the innate immune system whereby cells including macrophages, mast cells and dendritic and natural killer cells, converge at the site of injury. Once monocytes are rapidly recruited to the tissue, they differentiate into tissue macrophages. Traditionally, macrophages were divided into two major categories (M1/M2) depending on their activation status and inflammatory attitude, even though this paradigm has been recently expanded to account for their enormous functional plasticity (Chávez-Galán et al., 2015). On the contrary, chronic inflammation constitutes a major factor in the development of a large group of human degenerative disorders including some cancers, rheumatoid arthritis, asthma and atherosclerosis, among others.

After stimulation by Th1 cytokines or lipopolysaccharide (LPS), a classical pattern recognition molecule found on the surface of Gram-negative bacteria which dynamically programs innate immune responses (Beutler & Rietschel, 2003) macrophages are known to synthesize and release a myriad of molecules with proinflammatory and cytotoxic activity initiating the adaptive immune response. In addition, it has been established that the effects of these mediators are modulated by inducing the activation of the nuclear transcription factor Kappa B (NF- $\kappa$ B), activator protein (AP)-1 and mitogen activated protein kinases (MAPKs) (Krappmann et al., 2004). particularly, NF- $\kappa$ B activates a number of molecules involved in the inflammatory response, including inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6. Thus, the production of these mediators and cytokines through NF- $\kappa$ B stimulation might reflect the extent of inflammation and has been suggested as a measure to evaluate the effects of anti-inflammatory agents on the inflammatory process.

Taking this background into account, the aim of the present study was to address the effects of RmE on the inflammatory response induced by LPS, in murine macrophages. In this model, we attempted to characterize the cellular mechanisms underlying RmE

possible anti-inflammatory activities, evaluating NO production and protein expression of both proinflammatory enzymes COX-2, iNOS. Moreover, the role of NF- $\kappa$ B signalling pathway involved in this beneficial effect was also evaluated by western blot.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and preparation of *Retama monosperma* (L.) Boiss extracts

Aerial parts of *Retama monosperma* (L.) Boiss were harvested in the dune area of “El Rompido” spit (Huelva, Spain, 7°10' W, 37°12' N) on September, 2010, and identified by Dr. Juan Gallego-Fernández, Department of Plant Biology and Ecology, University of Seville. A voucher specimen (no. 277799) was deposited on the herbarium of the University of Seville for further reference. Plant samples were dried at room temperature. Then, for aqueous extract (H1), 200 grams of branches were powdered and extracted with water (400 mL) at 70 °C, under agitation using magnetic stirrer, during one hour. The water extract was lyophilized to provide a crude water extract with 14 % yield (28.7 g).

### 2.2. HPLC/MS/MS conditions

The water extract was dissolved in MeOH to obtain a concentration of 0.5 mg/mL and then filtered. Analysis was performed by HPLC tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) in negative multiple reaction monitoring (MRM) scanning mode, using Perkin Elmer Series 200 HPLC system (Wellesley, USA) equipped with an auto-sampler, binary pump system. Chromato-graphic separation was achieved by using a Zorbax Eclipse 2.1×150 mm, 3.5- $\mu$ m particle size XDB-C18column (Agilent). The mobile phase for chromatographic separation was composed of solvent A (0.1 % of formic acid in water) and solvent B (0.1 % of formic acid in acetonitrile) under gradient elution, starting at 10 % B, isocratic for 5 min, then increased linearly to 100 % B over 15 min, held constant for 5 min, then reduced linearly to 10 % B for 5 min and then held constant for an additional 5 min, at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 20  $\mu$ L. A mass spectrometer used for the detection was QTRAP system (Applied Biosystems, Foster City, USA), consisting of an hybrid triple quadrupole linear ion trap (QqQLIT), equipped with electrospray ionisation interface and the acquisition data processor Analyst® 1.4.2 software.

### 2.3. Animals and reagents

8–10 weeks-old male swiss mice, (Harlan Interfauna Ibérica®, Barcelona, Spain) weighing 20–30 g were placed in cages and maintained under constant conditions of temperature (20–25 °C) and humidity (40–60%) with a 12 h light/dark cycle and fed standard rodent chow (Panlab A04, Panlab, Seville, Spain) and water *ad libitum* throughout the experiment. All animal care and experimental procedures followed a protocol approved by the Animal Ethics Committee of the University of Seville, and all experiments were in accordance with the recommendations of the European Union regarding animal experimentation (Directive of the European Council 2010/630/EU).. RmE was always freshly prepared as stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO) (Panreac®, Barcelona, Spain) and diluted to desired concentration in the culture medium. The final concentration of DMSO in the culture medium was  $\leq$  1% in all experiments and it had not significantly influence cell response.

### 2.4. Isolation of murine peritoneal macrophages

Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of sterile thioglycollate medium (10% w/v) (Scharlau®, Barcelona, Spain). After 3 days, mice were killed and peritoneal exudate cells were harvest by washing the peritoneal cavity with sterile ice-cold PBS (Alleva et al., 2002). After centrifugation, cells were resuspended in RPMI 1640 medium (PAA®, Pasching, Austria) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAA®, Pasching, Austria), l-glutamine (2 mM), glucose (4.5 g/l), and HEPES buffer (10 mM), in the presence of 100 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 100 U/ml penicillin (PAA®, Pasching, Austria) and then, seeded in culture plates (1x10<sup>6</sup>cells/ml) for 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. After 2 h, non-adherent cells were removed washing with PBS and fresh RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS containing the treatment was added. After 30 min, murine peritoneal macrophages (1x10<sup>6</sup>cells/ml) were treated with 5 µg/ml of *lipopolysaccharides* (LPS) from *E. Coli* (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, US) in absence or presence of RmE (12.5, 25, 50 and 100 µg/mL) for 18 h. In each experiment, viability was always ≥ 95 %.

### 2.5. Cell viability

Cells seeded in 96-well plates (1x10<sup>5</sup> cells/well) were incubated in presence or absence of RmE for 24 h. At the end of the exposure time, the effect of RmE on cell growth/viability was analyzed by sulforhodamine B (SRB) assay (Skehan et al., 1990). After incubation time, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50 µl of 50% (w/v) cold of trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) and incubated for 60 min at 4°C. The supernatant was discarded and plates were washed 5 times with deionized water and dried. 50 µl of SRB (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) solution (0.4% w/v) in 1% acetic acid (Panreac®, Barcelona, Spain) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Plates containing SRB solution were washed 5 times with 1% acetic acid. Then, plates were air dried and 100 µl per well of 10 mmol/l Tris base pH 10.5 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) were added and the absorbance of each well was read on an enzyme-linked immunosorbent assay reader at 510 nm (BioTek®, Bad Friedrichshall, Germany). Finally, cell survival was measured as the percentage of absorbance compared with that obtained in control cells (non-treated cells).

### 2.6. Measurement of nitrites production

Cells in 24-well plate were untreated or treated with different concentrations of RmE (25, 50 or 100 µg/mL), and 30 min later stimulated with LPS for 18 h. The culture supernatants (100 µl) were transferred to a 96-well assay plate mixed with 100 µl of Griess reagent (Sigma®, St Louis, MO, USA) and incubated for 15 min at room temperature. The amount of nitrite, as an index of nitric oxide (NO) generation, was determined by a spectrophotometric method using the Griess reaction (Moorcroft et al., 2001) and obtained by extrapolation from a standard curve with sodium nitrite. The absorbance at 540 nm was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay reader (BioTek®, Bad Friedrichshall, Germany). Results were expressed as the nitrite production percentage compared with LPS control cells (stimulated untreated cells). 1 µM dexamethasone (Sigma®, St Louis, MO, USA) was used as positive control (data not shown).

### 2.7. Immunoblotting assay

Cells (1x10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated in presence or absence of RmE and stimulated with LPS for 18 h. After incubation, cells were rinsed, scraped off and collected in ice-cold PBS containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors and processed as described by Sánchez-Hidalgo et al. (Sánchez-Hidalgo et al., 2005). Protein concentration

was measured for each sample using a protein assay reagent (BioRad®, CA, USA) according to the Bradford's method and using  $\gamma$ -globuline as a standard (Bradford, 1976). Aliquots of supernatant contains equal amount of protein (20  $\mu$ g) were separated on 10% acrylamide gel by sodium dodecyl sulfatepolyacryamide gel electrophoresis. In the next step, the proteins were electrophoretically transferred into a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: rabbit anti-COX-2 and rabbit anti-iNOS (Cayman®, Ann Arbor, MI, USA) (1:2500 and 1:1000, respectively), rabbit anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , (Cell Signalling®, Danvers, MA, USA) (1:1000). To prove equal loading, the blots were analyzed for  $\beta$ -actin expression using an anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma Aldrich®, MO, USA). Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light-detecting kit (Pierce®, Rockford, IL, USA). The immunosignals were captured using LAS-3000 Imaging System from Fujifilm® Image Reader (Stamford, USA) and densitometric data were studied following normalization to the house-keeping loading control. The signals were analyzed and quantified by an Image Processing and Analysis in Java (Image J, Softonic®) and expressed in relation to the DMSO-LPS treated cells.

### 2.8. Statistical analysis

All values in the figures and text are expressed as arithmetic means  $\pm$  standard error (S.E.M). Experiments were carried out in triplicate. Data were evaluated with Graph Pad Prism® Version 2.01 software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA); using Tukey multiple comparisons test as post hoc test. *P* values of <0.05 were considered statistically significant. In the experiments involving densitometry, the figures shown are representative of at least three different experiments performed on different days.

## 3. Results

### HPLC/MS/MS analysis of flavonoids

Seven flavonoids, i.e. the flavonol rutin, the flavones luteolin and apigenin, and the isoflavones daidzin, genistin, daidzein and genistein, were identified and quantified by comparing their retention time and selected MRM transitions with standards (Table 1). The quantitative analysis showed that the major flavonoid of the aqueous extract was the isoflavone genistein (57.2 $\pm$ 0.3 mg/100 g).

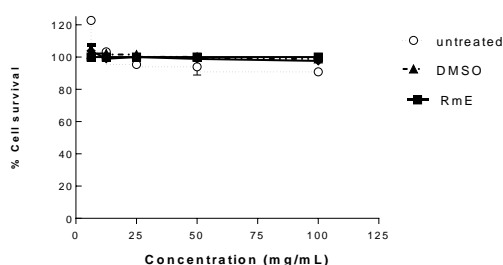
**Table 1.** Retention time (*R<sub>t</sub>*) and fragmentation patterns used for the identification of flavonoids.

Compound	Flavonoid	<i>R<sub>t</sub></i> (min)	Molar mass (g/mol)	Precursor ion/product ion 1 ( <i>m/z</i> )	Precursor ion/product ion 2 ( <i>m/z</i> )
1	Daidzin	8.67	416.38	415.1/223.1	415.1/252.1
2	Rutin	8.73	610.52	609.2/300.0	609.2/271.1
3	Genistin	10.10	432.37	431.2/239.1	431.2/268.0
4	Daidzein	10.20	254.23	253.1/133.1	253.1/222.9

5	Luteolin	10.30	286.24	285.1/133.0	285.1/151.0
6	Apigenin	10.80	270.24	269.1/117.0	269.1/151.0
7	Genistein	10.80	270.24	269.1/132.9	269.1/106.9

### ***Effect of extracts of Retama monosperma on cell viability***

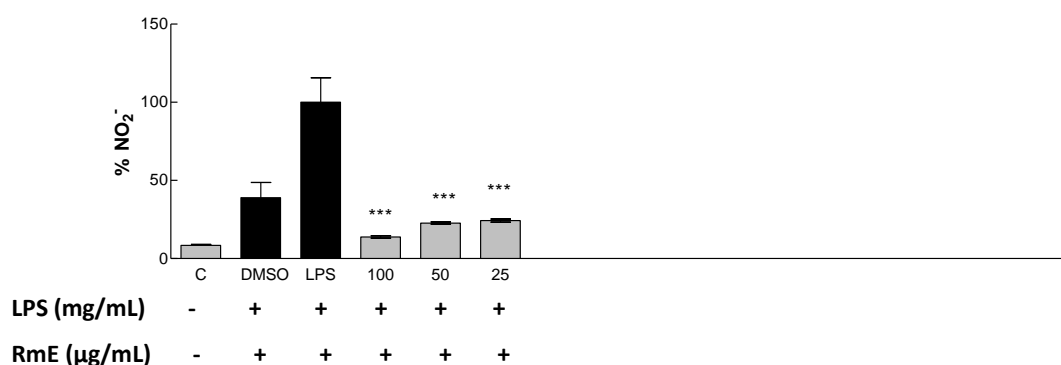
Our first aim was to evaluate the effect of *Retama monosperma* extract (RmE) treatment (6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/mL) on the cell viability of murine peritoneal macrophage cells in presence of LPS by SRB assay. After 18 h, our data demonstrated that RmE treatment at concentrations up to 100 mg/mL had no effect on murine macrophages viability as determined by SRB assay (Fig. 1).



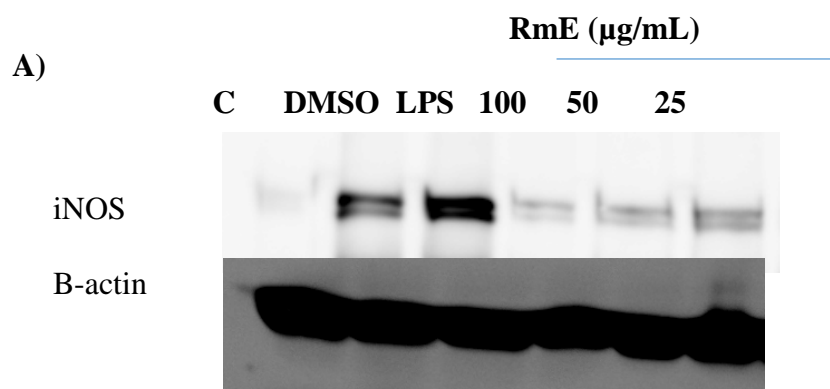
**Figure 1. Effects of RmE on cell viability.** The concentrations used in this study did not produced changes on murine peritoneal macrophages viability. Cells were untreated or treated with RmE (12.5, 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) for 24 h. Cell survival was measured as the percentage of absorbance compared with that obtained in control cells (non-treated cells). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for three independent experiments.

### ***Retama monosperma extracts inhibited nitrites production and suppressed the LPS-induced iNOS overexpression***

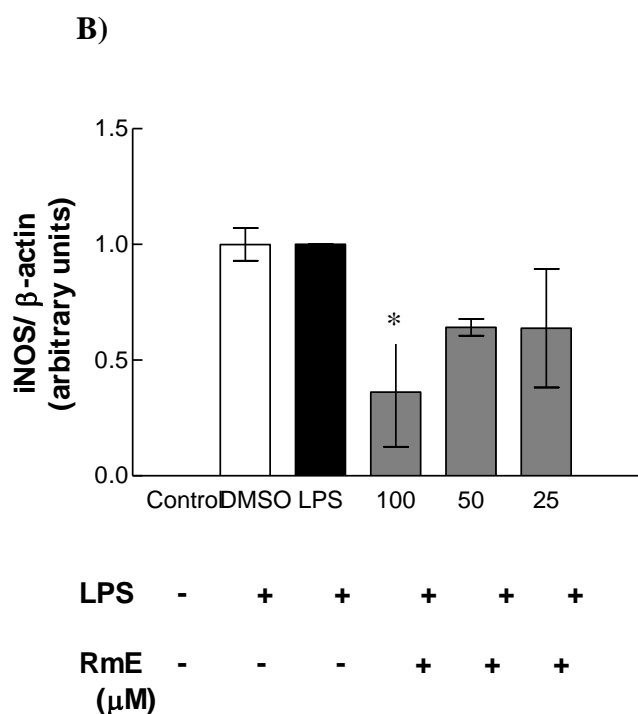
A large increase in  $\text{NO}_2^-$  concentrations, as an indicator NO production, was substantially induced in cells treated with LPS in comparison with those untreated cells for 18 hours. On the contrary, RmE treatment assayed, significantly elicited a  $\text{NO}_2^-$  reduction ( $p < 0.001$  vs. DMSO control) suggesting a possible downregulation of iNOS enzyme activity (Fig.2) that was lately confirmed measuring iNOS protein expression by western blot. Western blots revealed no detectable iNOS presence in unstimulated macrophages at 18h. On the contrary, after LPS stimulation, there was an increase in iNOS protein whereas a significant donwregulation of iNOS protein levels, was reported after 18 h incubation with RmE at 100 mg/ml concentration (\*\* $p < 0.01$  vs. DMSO control) (Fig 2).



**Figure 2. Effects of RmE on LPS-induced NO production in mouse peritoneal macrophages.** Cells were incubated with RmE and after 30 min, macrophages were treated with LPS for 18 h and nitrite generation was evaluated; Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS-DMSO treated control cells



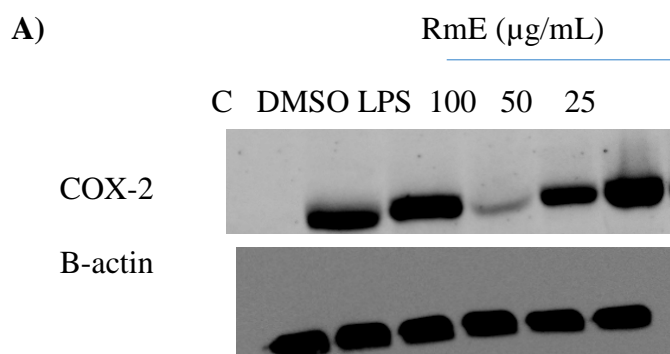


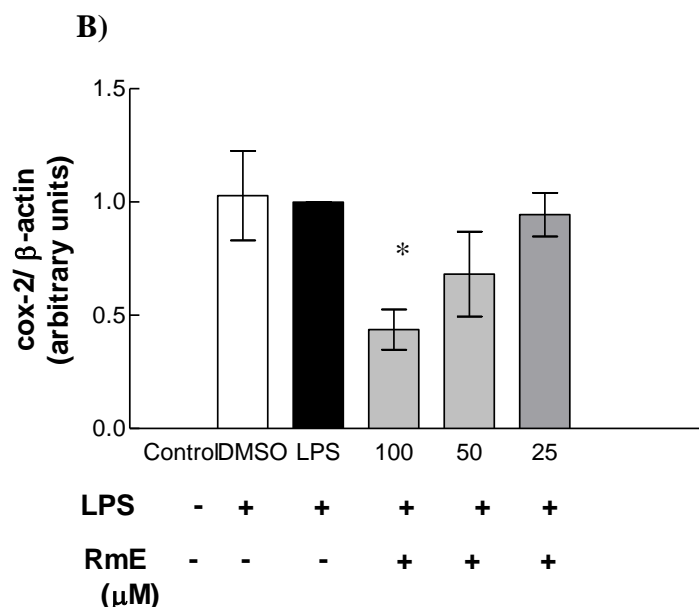


**Figure 3. Effects of RmE on LPS-induced iNOS protein expression in mouse peritoneal macrophages.** Cells were incubated with RmE and after 30 min, macrophages were treated with LPS for 18 h. The plots represent band intensity and were measured by Image J software. β-Actin was served as an equal loading control for normalization. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. LPS-DMSO treated control cells.

***Retama monosperma* extracts induced down-regulation in COX-2 overexpression induced by LPS**

Subsequently, we investigated the possible effect of RmE on inflammation-related enzyme COX-2 protein expression. Immunoblotting revealed that COX-2 protein expression was visibly induced by LPS treatment (Fig.4) However, a significant downregulation on this pro-inflammatory protein expression was observed in those cells treated with 100 mg/mL of aqueous RmE ( $p < 0.05$  vs. DMSO control) (Fig.4).



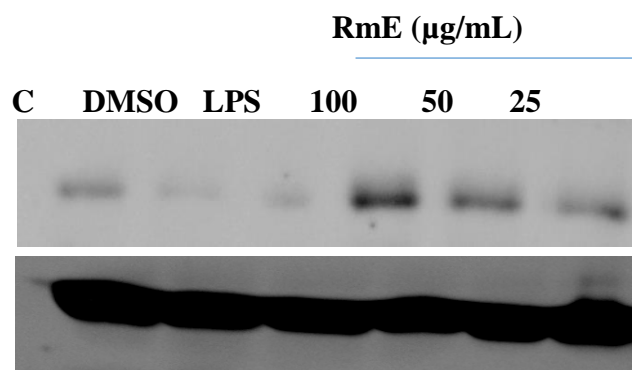


**Figure 4. RmE induced COX-2 protein expression downregulation in murine peritoneal isolated macrophages stimulated by LPS.** Cells were untreated or treated with RmE (25, 50 and 100 μg/mL) for 18 h in presence of LPS. As controls, cells were also treated with DMSO (solvent control) or left untreated in absence of LPS. The plots represent band intensity. β-Actin was served as an equal loading control for *normalization*. Data are represented as mean ± S.E.M. for four independent experiments. \* $p < 0.05$  significantly different from LPS-DMSO treated control cells.

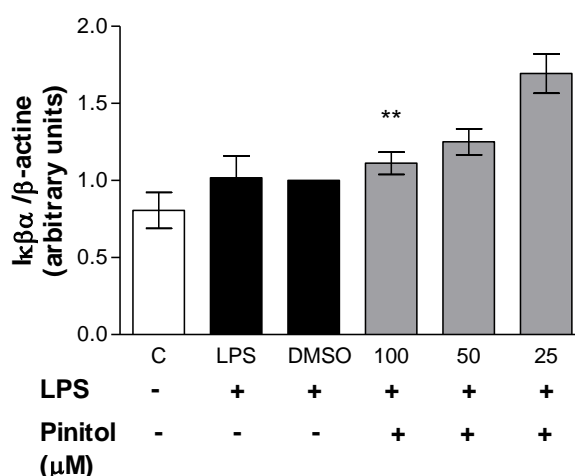
***Retama monosperma extracts prevented IκBα degradation in LPS-stimulated murine peritoneal macrophages***

Activation of most toll like receptors (TLR) on the macrophage surface, triggers a complex signalling pathway, which involves NF-κB activation. In the classical NF-κB pathway, a ternary IκB kinase (IKK) complex, formed by IKK-a, IKK-b, and NF-κB essential modulator, is responsible for inducing IκB phosphorylation, allowing the release of sequestered cytoplasmic NF-κB from IκB and its translocation to the nucleus controlling the expression of multiple proinflammatory genes involved in the inflammatory response such as iNOS and COX-2. In this sense, we tested the potential effect of RmE on the IκBα degradation in murine peritoneal macrophages. As shown in Fig.5, LPS stimulation produced a significant IκBα degradation whereas pre-treatment with RmE at 100 mg/mL prevented IκBα degradation in murine macrophages, which was previously increased after LPS stimulation ( $p < 0.05$  vs. DMSO control).

A)



B)



**Figure 5. RmE treatment inhibits NF-κB-mediated transcriptional activation preventing IκBα degradation in murine peritoneal isolated macrophages stimulated with LPS.** Cells were untreated or treated with RmE (25, 50 and 100 μg/mL) for 18 h in presence of LPS. As controls, cells were also treated with DMSO (solvent control) or left untreated in absence of LPS. The results are representative of three independent experiments. Densitometry was performed following normalization to the control (β-actin house-keeping gene). Data are expressed as the means ± S.E.M. for four independent experiments \* $p < 0.005$  vs. LPS-DMSO treated control cells

#### 4. Discussion

The aerial parts of *R. monosperma* spp., (Fabacea) have been traditionally used to prepare decoctions for the treatment of several diseases including diabetes, hypertension, and

rheumatism (Eddouks y cols., 2007; Maghrani y cols., 2005; Bremmer y cols., 2009). In this study we provide novel evidence for the anti-inflammatory activity of different standardised extracts of *Retama monosperma* (L.) Bois in murine isolated macrophages. Moreover, in an attempt to clarify the underlying mechanisms for its anti-inflammatory effects on cell based system we reported that RmE inhibits LPS-induced inflammatory response by i) reducing NO production, ii) decreasing protein expression of iNOS and COX2 and iii) inhibiting NF- $\kappa$ B activation in macrophages.

Initially, the flavonoids content were identified, which contained high proportions of flavonol rutin, the flavones luteolin and apigenin, and the isoflavones daidzin, genistin, daidzein and genistein. Exposure of peritoneal macrophages to LPS resulted in a significant increase of nitrite/nitrate levels, as an indicator of NO production, and an upregulation of iNOS expression. On the contrary, 18 h RmE treatment significantly were able to significantly suppressed LPS-induced production of NO and iNOS protein expression, compared with the untreated control. Elevated levels of NO have been detected in a variety of pathophysiological disorders, including cardiovascular dysfunction (matsubara y cols., 2015; Popplo y cols., 2013), neurodegeneration, inflammation (Doherty, 2011; Varga y cols., 2015) and carcinogenesis (Farinati y cols., 2010)[x]. NO has been generally considered as one of the key players involved in immunity and inflammation. NO represents a relevant hallmark of macrophage activation states in pathological settings and justify relevant and divergent roles in inflammation. NO is produced endogenously during arginine metabolism by different isoforms of nitric oxide synthase (NOS). Particularly, the human (and mouse) genome contains three different genes encoding NO synthases: nNOS (NOS-1) found in neurons, eNOS (NOS-3) present in the endothelial cells that line the lumen of blood vessels and iNOS (NOS-2) found in macrophages. Whereas the levels of nNOS and eNOS are relatively steady, expression of iNOS genes awaits an appropriate stimulus such as interferon- $\gamma$ , LPS and a variety of proinflammatory cytokines (Li et al., 2012). In fact, it is established that iNOS is responsible for the overproduction of NO which is often observed during chronic inflammatory disorders and tumor development (Brown y Borutaite, 2001, Li et al., 2012). Likewise, COX-2 is also an important pro-inflammatory enzyme essential to inflammation, injury repair, and carcinogenesis. COX-2 over-expression, leads to the production of ROS and excessive PGE2 and TXB2, which are important inflammatory mediators that contribute to the hyperemia, edema and even dysfunction thereby inducing tissue damage (O'Connor et al., 2010). In this sense, our results reveal that exposure of peritoneal macrophages to LPS resulted in a significant increase of nitrite/nitrate levels, as an indicator of NO production, after a 24 h incubation as well as an upregulation of both COX-2 and iNOS expression. Conversely, 2 h pre-treatment with RmE was able to inhibit significantly NO production and the protein expression of both inflammation mediators enzymes iNOS and COX-2 produced under LPS-stimulation in murine isolated macrophages, indicating a potential dual action on these proteins and suggesting an inflammatory activity reduction.

On the other hand, the nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway has long been considered a prototypical proinflammatory signaling pathway, largely based on the role of NF- $\kappa$ B in the expression of proinflammatory genes including cytokines, chemokines, and adhesion molecules (Tak and Firestein, 2001, Lee and Surh, 2012). According to our results, we detected that RmE treatment induced an increase of I $\kappa$ B $\alpha$  suggesting an additional pathway by which RmE abolished LPS-mediated inflammation in murine macrophages. Our data are in deal with our previous report where we confirmed that RmE treatment

was capable of preventing the damage in acute colitis, probably by NF $\kappa$ B signalling pathway (Gonzalez-Mauraza y cols., 2014).

In our study, we describe, for the first time, the anti-inflammatory effect of RmE on LPS-activated murine macrophages. Our data confirm that NF $\kappa$ B signal pathway could be critical to establish the anti-inflammatory effects of RmE in this experimental *in vitro* model of inflammation. These beneficial anti-inflammatory effects of RmE might be attributed, at least in part, to its high content of flavonoids, such as genistein, daidzein and their glucosides, rutin, apigenin and luteolin. Moreover, some of these flavonoids have exerted promising antioxidative and anti-inflammatory properties in LPS-induced acute inflammatory response in human and murine macrophages. In fact, emerging studies have revealed that daidzein treatment inhibits significantly the NO production induced by LPS as well as iNOS LPS-induced protein expression in murine RAW264.7 macrophages (Choi et al., 2012). Similarly, *in vitro* assays have demonstrated a significant reduction in LPS-stimulated macrophages treated with apigenin (Nicholas et al., 2007; Zhan et al., 2014), rutin (Guruvayoorappan & Kuttan 2007, Lee et al., 2015), luteolin (Chen et al., 2007; Hu & Kitts, 2004) and genistein (Ji et al., 2012; Cui & Bilitewski, 2014).

Nevertheless, although flavonoids seem to exert a key role in the anti-inflammatory effect of RmE, other minor bioactive compounds present in the extract or the combination of them might contribute synergically to this beneficial effect. Altogether, RmE might suppose an improvement in public health on the prevention of chronic pathologies with high prevalence in the population.

### **Acknowledgements**

This study was supported by research Grants from Ministerio de Economía y Competitividad, ISCIII, Eur J Nutr 1 3 FEDER (AGL 2008-02475 and AGL 2011-26949) and Junta de Andalucía (P-10AGR-6609). M.A.S. gratefully acknowledges support from a Postgraduate National Program of FPU fellowship and financial sponsorship from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. The authors gratefully acknowledge the assistance of Center for Technology and Innovation Research, University of Seville (CITIUS).

### **5. References**

- Benitez Cruz, G., 2007. El uso de las plantas a través de la cultura tradicional Lojeña
- Bremmer P, Rivera D, Calzado MA, Obon C. 2009 Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal Ethnopharmacology*, **127**, 295-305.
- Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., Fernández de Mattos, S., Amzazi, S., Villalonga, P., 2014. Retama monosperma n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. *BMC Complement Altern Med*. 24,14:38. doi: 10.1186/1472-6882-14-38.

Belmokhtar, Z., Harche, MK., 2014. In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss. Nat Prod Res. 28(24),2324-9. doi: 10.1080/14786419.2014.934237

Beutler, B., and E. T. Rietschel. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. Nat. Rev. Immunol. 3:169

Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M.A., Obón, C., Inocencio, C., Beckwith, C., Fiebich, B.L., Muñoz, E., Heinrich, M., 2009. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. J Ethnopharmacol 115, 295–305

Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., Garcia, I., 2015 Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+)Macrophages. Front Immunol. 26,6:263. doi: 10.3389/fimmu.2015.00263. eCollection 2015

Chun Hu and David D.2004. Rutin Attenuates Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production in Macrophage Cells. Kitts Molecular and Cellular Biochemistry 265: 107–113, 2004.

Doherty GH. Nitric oxide in neurodegeneration: potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. Neurosci Bull. 2011 Dec;27(6):366-82. doi: 10.1007/s12264-011-1530-6.

Eddouks M, Maghrani M, Loudec L, Haloui M, Michel JB. 2007. Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7, 65-77

Farinati F1, Picicocchi M, Lavezzo E, Bortolami M, Cardin R. Dig Dis. 2010;28(4-5):579-84. doi: 10.1159/000320052. Epub 2010 Nov 18. Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis.

El-Toumy, S.A, Farrag, A.H., Ellithey, M.M, Korien K.M., 2011. Effect of plant derived-phenolic extracts on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. J Pharm Res 4, 189–192.

González-Mauraza, H., Martín-Cordero, C., Alarcón-de-la-Lastra C., Rosillo, M.A., León-González, A.J., Sánchez-Hidalgo, M., 2014. Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats. J Physiol Biochem.70(1), 163-72. doi: 10.1007/s13105-013-0290-3..

Käs E, Wink M., 1994. Phylogenetic Relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL9 and ncDNA (ITS 1 nad 2)). Mol Phylogenet. Evol. 8, 65-88

Matsubara K1, Higaki T2, Matsubara Y3, Nawa A4. Int J Mol Sci. 2015 Mar 2;16(3):4600-14. doi: 10.3390/ijms16034600. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia.

Maghrani M, Michel JB, Eddouks M. (2005a) Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. Phytotherapy Research, 19, 125-128.

Merghoub, N., Benbacer, L., El Btaouri, H., Ait Benhassou, H., Terryn, C., Attaleb, M., Madoulet, C., Benjouad, A., El Mzibri, M., Morjani, H., Amzazi, S., 2011 In vitro antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 15,57

Moore, M.M., Chua, W., Charles, K. A., Clarke, S., 2010 J. Inflammation and cancer: causes and consequences *Clin. Pharmacol. Ther.*, 87, 504-508.

Popolo A1, Autore G, Pinto A, Marzocco S. *Free Radic Res*. 2013 May;47(5):346-56. doi: 10.3109/10715762.2013.779373. Epub 2013 Mar 25. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure.

Seung-Jae Lee<sup>1</sup>, Seung Yuan Lee<sup>1</sup>, Hyun Joo Ha<sup>2</sup>, Seon Heui Cha<sup>3</sup>, Si Kyung Lee<sup>4</sup>, Sun Jin Hur<sup>1,\*</sup> *Journal of Food and Nutrition Research*, 2015, Vol. 3, No. 3, 202-205 Available online at <http://pubs.sciepub.com/jfnr/3/3/12> © Science and Education Publishing DOI:10.12691/jfnr-3-3-12

Krappmann, D., Wegener, E., Sunami, Y., Esen, M., Thiel, A., Mordmuller, B., Scheidereit, C., 2004. The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol*. 24(14),6488-6500

Varga ZV<sup>1</sup>, Giricz Z<sup>2</sup>, Liaudet L<sup>3</sup>, Haskó G<sup>4</sup>, Ferdinandy P<sup>5</sup>, Pacher P<sup>6</sup>. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1852(2):232-42. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.030. Epub 2014 Jul 2. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy.





**CAPÍTULO III: D-PINITOL INHIBITS LPS-INDUCED  
INFLAMMATORY RESPONSE IN MURINE PERITONEAL  
MACROPHAGES BLOCKING NF-KB SIGNALLING PATHWAY**

### **D-Pinitol inhibits LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages via NF- $\kappa$ B signalling pathway**

Nuria Haidee González-Mauraza., Carmen Martin-Cordero., Marina Aparicio-Soto M.,  
Catalina Alarcón de la Lastra., Marina Sánchez-Hidalgo\*

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville.  
Profesor García González Street 2, 41012 Seville, Spain.  
[hidalgosanz@us.es](mailto:hidalgosanz@us.es)

#### **Abstract**

**Background:** Emerging evidences demonstrate that D-pinitol (3-O-methyl-chiroinositol), a natural monosaccharide present in pine and legumes exerts multifunctional properties, including feeding stimulant, anti-hyperlipidemic, antihyperglycemic, anti-inflammatory, cardioprotective and chemotherapeutic properties. However, its effects in inflammatory response as well as cellular/molecular mechanisms involved remains unclear. **Aims:** In the present study, we investigated the effects of D-Pinitol (12.5, 25, 50 and 100  $\mu$ M) on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated inflammatory response in murine peritoneal macrophages and deep insight into action mechanisms involved in its anti-inflammatory effect. **Methods:** Cell viability was determined using sulphorhodamine (SRB) assay. Nitric oxide (NO) production was assayed using the Griess reaction. Moreover, the protein expression of cyclooxygenase (COX)-2 and the inducible synthase nitric oxide (iNOS) as well as the role of the nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signalling pathway was determined by Western blot. **Results:** LPS induced inflammatory response was characterized by an increase in NO production and an upregulation of COX-2 and iNOS protein expressions followed by a remarkable decrease in NF- $\kappa$ B-inhibitory protein ( $I\kappa$ B $\alpha$ ). On the contrary, D-Pinitol (at  $\mu$ M range) exerted anti-inflammatory effects inhibiting LPS-induced nitrites production in murine peritoneal macrophages and decreasing the proinflammatory COX-2 and iNOS protein expressions without affecting cellular viability. In addition, D-Pinitol prevented the inhibitory kappa B alpha protein ( $I\kappa$ B $\alpha$ ) degradation. **Conclusion:** our results provide mechanistic evidence that D-Pinitol inhibits LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages through NF- $\kappa$ B signalling pathway suggesting that D-Pinitol and synthetic derivatives may be an attractive therapeutic strategy for the management of inflammatory diseases.

**Keywords:** COX-2, D-Pinitol, inflammation, macrophages, NF- $\kappa$ B, NO

#### **1. Introduction**

Macrophages and other phagocytotic cells provide a front-line defense against bacterial infection and play a critical role in inflammation stimulating the inflammatory responses of neutrophils, fibroblasts and endothelial cells in response infection. Macrophages exhibit a particularly vigorous response to bacterial lipopolysaccharides (LPS), the major outer surface membrane components present in almost all Gram-negative bacteria. LPS act as extremely strong stimulators of innate immunity in diverse eukaryotic species ranging from insects to humans, inducing a variety of inflammatory modulators. LPS stimulation disrupts the balance of the intracellular redox state, which leads to oxidative stress characterized by a major shift in the cellular redox balance and is usually

accompanied by damage mediated by reactive oxygen species (ROS), and leads to the increased secretion of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) which act to broadly provoke the inflammatory response [1]. Besides, macrophages express pro-inflammatory enzymes including inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase(COX)-2 that are the responsible for the nitric oxide (NO) production and prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, respectively, during inflammation process. Progress in our understanding of inflammatory signalling pathways has identified new targets, notably in pathways involving nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B), p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) [2].

The development of novel anti-inflammatory agents with therapeutic potential and lower toxicity continues being necessary to combat various complex inflammatory processes. In this sense, LPS-stimulation constitutes an excellent model for the screening and subsequent evaluation of the effects of candidate drugs on the inflammatory pathway [3]. D-Pinitol (3-O-methyl-D-chiro-inositol), a natural monosaccharide found in high concentrations in pine wood, alfalfa, legumes, carob pods and soy beans, has remarkable beneficial effects on human health [4, 5]. Over the few last years, a number of emergent studies have provided that D-Pinitol possesses functional versatility, including feeding stimulant, anti-hyperlipidemic, antihyperglycemic, anti-inflammatory, cardioprotective and chemotherapeutic properties [5-8]. These functions are connected with its ability to attenuate or suppress oxidative stress and the inflammatory process both in *in vivo* and *in vitro*. D-Pinitol induces human breast cancer cell (MCF-7) death via p53 and Bax induction and Bcl-2 and NF- $\kappa$ B signalling pathway inhibition [9]. Moreover, recent reports have also documented its critical role in the amelioration of the pathogenetic process of allergic airway inflammation [10] as well as its antiinflammatory activities of D-Pinitol and glucosamine either alone or in combination against carrageenan- and cotton pellet-induced acute and subacute inflammation in rats [11]. Similarly, D-Pinitol has been reported to inhibit LPS-induced MAPKs activation and NF- $\kappa$ B nuclear translocation in dendritic cells [12].

Thus, in the present study, we examined the effects of d-D-Pinitol in LPS-induced inflammatory response in peritoneal murine macrophages and further explored the potential cellular/molecular mechanisms involved in its anti-inflammatory effects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and reagents

8–10 weeks-old male swiss mice, (Harlan Interfauna Ibérica®, Barcelona, Spain) weighing 20-30 g were placed in cages and maintained under constant conditions of temperature (20-25 °C) and humidity (40-60%) with a 12 h light/dark cycle and fed standard rodent chow (Panlab A04, Panlab, Seville, Spain) and water *ad libitum* throughout the experiment. All animal care and experimental procedures followed a protocol approved by the Animal Ethics Committee of the University of Seville, and all experiments were in accordance with the recommendations of the European Union regarding animal experimentation (Directive of the European Council 2010/630/EU).. D-Pinitol was purchased by Sigma-Aldrich® Co (Dorset, UK) and was always freshly prepared as stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO) (Panreac®, Barcelona, Spain) and diluted to desired concentration in the culture medium. The final concentration of DMSO in the culture medium was  $\leq$  1% in all experiments and it had not significantly influence cell response.

### 2.2. Isolation of murine peritoneal macrophages

Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of sterile thioglycollate medium (10% w/v) (Scharlau®, Barcelona, Spain). After 3 days, mice were killed and peritoneal exudate cells were harvest by washing the peritoneal cavity with sterile ice-cold PBS [13]. After centrifugation, cells were resuspended in RPMI 1640 medium (PAA®, Pasching, Austria) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAA®, Pasching, Austria), l-glutamine (2 mM), glucose (4.5 g/l), and HEPES buffer (10 mM), in the presence of 100 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 100 U/ml penicillin (PAA®, Pasching, Austria) and then, seeded in culture plates (1x10<sup>6</sup>cells/ml) for 2 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. After 2 h, non-adherent cells were removed washing with PBS and fresh RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS containing the treatment was added. After 30 min, murine peritoneal macrophages (1x10<sup>6</sup>cells/ml) were treated with 5 µg/ml of *lipopolysaccharides* (LPS) from *E. Coli* (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, US) in absence or presence of melatonin (12.5, 25, 50 and 100 µM) for 18 h. In each experiment, viability was always ≥ 95 %.

### 2.3. Cell viability

Cells seeded in 96-well plates (1x10<sup>5</sup> cells/well) were incubated in presence or absence of D-Pinitol for 24 h. At the end of the exposure time, the effect of D-Pinitol on cell growth/viability was analyzed by sulforhodamine B (SRB) assay [14]. After incubation time, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50 µl of 50% (w/v) cold of trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) and incubated for 60 min at 4°C. The supernatant was discarded and plates were washed 5 times with deionized water and dried. 50 µl of SRB (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) solution (0.4% w/v) in 1% acetic acid (Panreac®, Barcelona, Spain) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Plates containing SRB solution were washed 5 times with 1% acetic acid. Then, plates were air dried and 100 µl per well of 10 mmol/l Tris base pH 10.5 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) were added and the absorbance of each well was read on an enzyme-linked immunosorbent assay reader at 510 nm (BioTek®, Bad Friedrichshall, Germany). Finally, cell survival was measured as the percentage of absorbance compared with that obtained in control cells (non-treated cells).

### 2.4. Measurement of nitrites production

Cells in 24-well plate were untreated or treated with different concentrations of D-Pinitol (25, 50 or 100 µM), and 30 min later stimulated with LPS for 18 h. The culture supernatants (100 µl) were transferred to a 96-well assay plate mixed with 100 µl of Griess reagent (Sigma®, St Louis, MO, USA) and incubated for 15 min at room temperature. The amount of nitrite, as an index of nitric oxide (NO) generation, was determined by a spectrophotometric method using the Griess reaction [15] and obtained by extrapolation from a standard curve with sodium nitrite. The absorbance at 540 nm was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay reader (BioTek®, Bad Friedrichshall, Germany). Results were expressed as the nitrite production percentage compared with LPS control cells (stimulated untreated cells).

### 2.5. Immunoblotting assay

Cells (1x10<sup>6</sup> cells/ml) were incubated in presence or absence of D-Pinitol and stimulated with LPS for 18 h. After incubation, cells were rinsed, scraped off and collected in ice-cold PBS containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors and processed as described by Sánchez- Hidalgo et al. [16]. Protein concentration was measured for each

sample using a protein assay reagent (BioRad®, CA, USA) according to the Bradford's method and using  $\gamma$ -globuline as a standard [17]. Aliquots of supernatant contains equal amount of protein (20  $\mu$ g) were separated on 10% acrylamide gel by sodium dodecyl sulfatepolyacryamide gel electrophoresis. In the next step, the proteins were electrophoretically transferred into a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: rabbit anti-COX-2 and rabbit anti-iNOS (Cayman®, Ann Arbor, MI, USA) (1:2500 and 1:1000, respectively), rabbit anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , (Cell Signalling®, Danvers, MA, USA) (1:1000). To prove equal loading, the blots were analyzed for  $\beta$ -actin expression using an anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma Aldrich®, MO, USA). Immunodetection was performed using enhanced chemiluminescence light-detecting kit (Pierce®, Rockford, IL, USA). The immunosignals were captured using LAS-3000 Imaging System from Fujifilm® Image Reader (Stamford, USA) and densitometric data were studied following normalization to the house-keeping loading control. The signals were analyzed and quantified by an Image Processing and Analysis in Java (Image J, Softonic®) and expressed in relation to the DMSO-LPS treated cells.

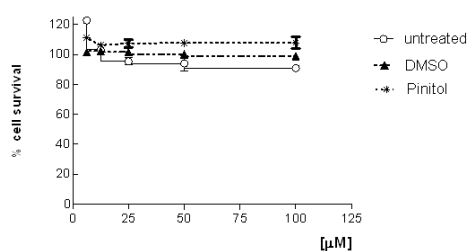
## 2.6. Statistical analysis

All values in the figures and text are expressed as arithmetic means  $\pm$  standard error (S.E.M). Experiments were carried out in triplicate. Data were evaluated with Graph Pad Prism® Version 2.01 software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA); using Tukey multiple comparisons test as post hoc test. *P* values of  $<0.05$  were considered statistically significant. In the experiments involving densitometry, the figures shown are representative of at least three different experiments performed on different days.

## 3. Results

### 3.1. Effect of D-Pinitol on cell viability

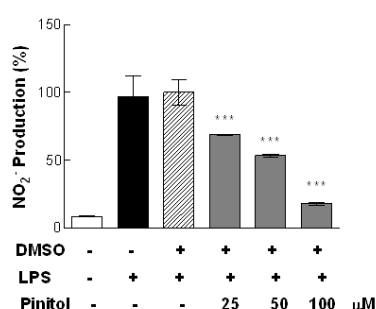
Our first aim was to evaluate the effect of D-Pinitol treatment on the cell viability of murine peritoneal macrophage cells in presence of LPS. It is well-known that activation of macrophages by LPS leads to the increased secretion of a large set of proinflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1), oxygen, and nitrogen species [1]. We evaluated the effect of D-Pinitol (6.25-100  $\mu$ M) on the growth of these cells by SRB assay. Macrophages were pretreated with D-Pinitol for 2 h and then treated with LPS (5  $\mu$ g/mL) or vehicle control for 18 h. After 18 h incubation time, our data demonstrated that D-Pinitol treatment at concentrations up to 100  $\mu$ M had no effect on murine macrophages viability as determined by SRB assay (Fig. 1).



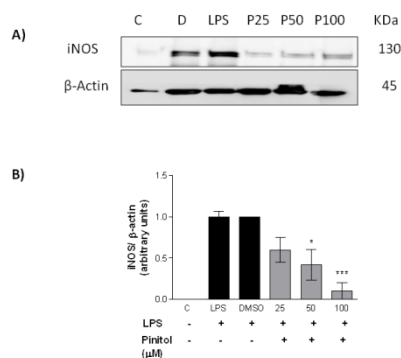
**Figure 1. Effects of D-Pinitol on cell viability.** The concentrations used in this study did not produced changes on murine peritoneal macrophages viability. Cells were untreated or treated with D-Pinitol (12.5, 25, 50 and 100  $\mu$ M) for 24 h. Cell survival was measured as the percentage of absorbance compared with that obtained in control cells (non-treated cells). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for three independent experiments.

### 3.2. D-Pinitol inhibited nitrites production and suppressed the LPS-induced iNOS overexpression

To investigate if D-Pinitol has anti-inflammatory properties, nitrites production, as an indicator NO production, was measured in the presence or absence of different concentrations of D-Pinitol. When LPS was administered to peritoneal murine macrophages, the NO production increased dramatically from the basal level after 24 h incubation in comparison with those untreated cells. However, D-Pinitol treatment significantly elicited a  $\text{NO}_2^-$  reduction ( $***p < 0.001$  vs. DMSO control) suggesting a possible downregulation of iNOS enzyme activity (Fig. 3) that was lately confirmed measuring iNOS protein expression by western blot. Immunoblotting analysis demonstrated a significant decrease in iNOS protein levels, after incubation for 18 h with 50 and 100  $\mu\text{M}$  of D-Pinitol ( $*p < 0.05$  and  $***p < 0.001$  vs. DMSO control) (Fig. 3).



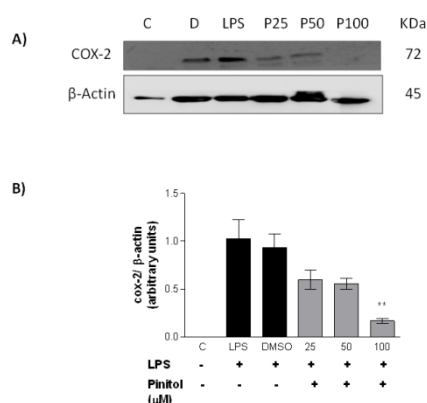
**Figure 2. Effects of D-Pinitol on LPS-induced NO production in mouse peritoneal macrophages.** Cells were incubated with D-Pinitol and after 30 min, macrophages were treated with LPS for 18 h and nitrite generation was evaluated; Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments.  $***p < 0.001$  vs. LPS-DMSO treated control cells.



**Figure 3. Effects of D-Pinitol on LPS-induced iNOS protein expression in mouse peritoneal macrophages.** Cells were incubated with D-Pinitol and after 30 min, macrophages were treated with LPS for 18 h. The plots represent band intensity and were measured by Image J software.  $\beta$ -Actin was served as an equal loading control for normalization. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments.  $*p < 0.05$  and  $***p < 0.001$  vs. LPS-DMSO treated control cells.

### 3.3. D-Pinitol induced downregulation on LPS-induced COX-2

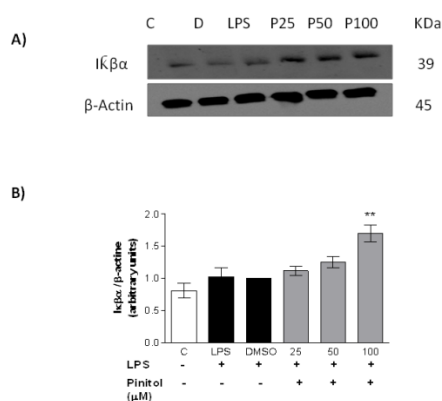
Subsequently, we investigated the possible effect of D-Pinitol on COX-2 proinflammatory enzyme. COX-2 protein expression was visibly upregulated by LPS treatment (Fig.4). However, a significant down-regulation on this pro-inflammatory protein expression was observed in those cells treated with 100  $\mu\text{M}$  D-Pinitol ( $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$  vs. DMSO control) (Fig. 4).



**Figure 4. D-Pinitol induced COX-2 protein expression downregulation in murine peritoneal isolated macrophages stimulated by LPS.** Cells were untreated or treated with D-Pinitol (25, 50 and 100  $\mu$ M) for 18 h in presence of LPS. As controls, cells were also treated with DMSO (solvent control) or left untreated in absence of LPS. The plots represent band intensity.  $\beta$ -Actin was served as an equal loading control for *normalization*. Data are represented as mean  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments.  $**p < 0.01$  significantly different from LPS-DMSO treated control cells.

### 3.4. D-Pinitol prevented *I $\kappa$ B $\alpha$* degradation in murine peritoneal macrophages

NF- $\kappa$ B pathway is regulated by activation of *I $\kappa$ B* kinase (IKK) complex, which phosphorylates cytosolic *I $\kappa$ B* proteins (e.g. *I $\kappa$ B $\alpha$* ). Under unstimulated conditions *I $\kappa$ B $\alpha$*  binds to NF- $\kappa$ B transcription factors (p50/p65) and retain them in the cytosol. Upon phosphorylation by IKK complex, *I $\kappa$ B $\alpha$*  proteins undergo ubiquitination and proteasome-dependent degradation resulting in the release of NF- $\kappa$ B transcription factors. These transcription factors then translocate into the nucleus and evoke expression of proinflammatory cytokines and chemokines [18, 19]. In this sense, we tested the potential effect of D-Pinitol on the *I $\kappa$ B $\alpha$*  degradation in murine peritoneal macrophages. As shown in Fig. 5, LPS stimulation produced an *I $\kappa$ B $\alpha$*  degradation whereas pre-treatment with 100  $\mu$ M D-Pinitol prevented *I $\kappa$ B $\alpha$*  degradation ( $***p < 0.001$  vs. DMSO control).



**Figure 5. D-Pinitol treatment inhibits NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional activation preventing *I $\kappa$ B $\alpha$*  degradation in murine peritoneal isolated macrophages stimulated with LPS.** Cells were untreated or treated with D-Pinitol (25, 50 and 100  $\mu$ M) for 18 h in presence of LPS. As controls, cells were also treated with DMSO (solvent control) or left untreated in absence of LPS. The results are representative of three independent experiments. Densitometry was performed following normalization to the control ( $\beta$ -actin house-keeping gene). Data are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments  $**p < 0.01$  vs. LPS-DMSO treated control cells.

## 4. Discussion

In the present study, we show the ability of D-Pinitol to attenuate or suppress oxidative stress and the inflammatory process preventing the LPS-induced NO production and iNOS and COX-2 overexpression via NF- $\kappa$ B signaling pathway in murine peritoneal isolated macrophages.

Macrophages play a critical role in the initiation, maintenance, and resolution of inflammation. They are activated and deactivated in the inflammatory process. Activation signals include cytokines (IFN- $\gamma$ , granulocyte-monocyte colony stimulating factor and TNF- $\alpha$ ), bacterial LPS, extracellular matrix proteins, and other chemical mediators [1]. Once macrophages are activated, rapidly synthesize and release primary inflammatory mediators aimed at destroying the foreign agents including ROS, bradykinin, histamine, cytokines and chemokines. These mediators dilate local blood vessels and increase their permeability leading to leakage of plasma proteins into the tissue. They also increase pain sensitivity in tissues innervated by sensory nerve endings, and attract leukocytes that migrate along a chemotactic path from blood into the tissue.

Particularly, NO is a multi-functional biomolecule involved in a variety of physiological and pathological processes including atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and even cancer. It is well known that NO have a biphasic, dose-dependent effect. Low concentrations of NO have been shown to be cytoprotective against oxidative stress-induced cell death, whereas high concentrations of it are cytotoxic to many types of cells. The production of large amounts of NO and nitrate (NO<sub>3</sub>) by mouse macrophages stimulated with LPS [20] and the L-arginine-dependency of the NO generation and of the tumor cytotoxic activity of activated macrophages were the pioneering observations that ignited the interest on this small inorganic radical. In addition, many reports have implicated that sustained and/or excess NO generation, most of which is attributable to iNOS expression, often occurs in pathogenic conditions. In particular, iNOS has drawn considerable attention for its critical functions in inflammation-related diseases [21]. Similarly, elevated COX-2 expression is closely related to the pathogenesis of inflammation [22] and certain inflammatory cytokines produced by activated macrophages induce COX-2 expression via an NF- $\kappa$ B pathway [23] which in turn synthesizes prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, a secondary mediator of inflammation that promotes local vasodilation and attraction and activation of neutrophils, macrophages and mast cells during acute inflammation. As the inducible COX isoform, COX-2 is generally regarded as a pro-inflammatory enzyme and contributes to tissue injury. It is markedly induced by bacterial endotoxins, cytokines and growth factors, and catalyzes the synthesis of pro-inflammatory PGs. In fact, blocking of inflammatory enzymes like COX-2 represents important pharmacological tools for the treatment of inflammatory related diseases [24]. In the present study, we observed that exposure of peritoneal macrophages to LPS resulted in a significant increase of nitrite/nitrate levels, as an indicator of NO production, after a 24 h incubation as well as an upregulation of both COX-2 and iNOS expression. Conversely, the present study reveals, for the first time, that 2 h pre-treatment with D-Pinitol at  $\mu$ M range was able to inhibit significantly NO production and the protein expression of both inflammation mediators enzymes iNOS and COX-2 produced under LPS-stimulation, for the 24 h incubation period in LPS-stimulated murine isolated macrophages, indicating a potential dual action on these proteins and suggesting an inflammatory activity reduction. These results are in agreement with a previous report by Kim et al., where the anti-inflammatory activity of D-Pinitol has been documented against carrageenan- and cotton pellet-induced acute and sub-acute inflammation in rats [11] and Lee et al. have demonstrated that D-Pinitol could inhibit ovalbumin-induced airway inflammation, a murine model of asthma, in rats [10]. D-Pinitol reduced allergic airway



inflammation and hyperresponsiveness due to the alteration of Th1/Th2 polarization via the suppression of GATA-3 and increase of T-bet expression. Similarly, the protective effect of D-Pinitol has been also reported on fatty changes, infiltration of inflammation cells, and tissue necrosis against chemically-induced liver damage in rats [25].

In addition, D-Pinitol has been shown to inhibit the NF- $\kappa$ B activation pathway, which may explain its ability to suppress inflammatory cellular responses [6]. NF- $\kappa$ B is a pleiotropic transcription factor that regulates a wide range of genes involved in inflammation, autoimmune, apoptosis and tumorigenesis. Under resting conditions, NF- $\kappa$ B consists of a dimeric transcription factor composed of p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B 1 (p50/p105) or NF- $\kappa$ B 2 (p52/p100), exists in the cytoplasm as an inactive complex with the inhibitory protein, I $\kappa$ B $\alpha$ . Only when it is activated under and translocated to the nucleus is the sequence of events leading to activation initiated. Consequently, NF- $\kappa$ B binds to  $\kappa$ B enhancer elements present in the promoter region of many pro-inflammatory genes including iNOS and COX-2 [26, 27]. Interestingly, in the present study, we found that D-D-Pinitol blocked LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in mouse macrophages, inhibiting the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and preventing the translocation of p65 into the nuclei. As mentioned above, this was accompanied by a downregulation of the proinflammatory enzymes COX-2 and iNOS. These results agree with a report that showed the ability of 80  $\mu$ M D-Pinitol to suppress the LPS-induced activation of ERK1/2, JNK, and p38 MAPK, as well as NF- $\kappa$ B nuclear translocation, in dendritic cells derived from murine bone marrow cells [12]. Moreover, D-Pinitol inhibits phenotypic maturation and modulates cytokine production in these dendritic, resulting in a significant inhibition of Th1 development. Similar effects were reported in breast and prostate cancer where D-Pinitol treatment was able to induce apoptosis and inhibit NF- $\kappa$ B nuclear translocation [9, 28, 29].

### **Conclusion**

Collectively, this study establishes, for the first time, that D-Pinitol inhibits LPS-induced inflammatory responses via direct downregulation of NO levels in murine macrophages. These protective effects seem to be due to a downregulation of iNOS and COX-2 expression via NF- $\kappa$ B signalling pathway and thus may have potential application as a therapeutic agent in treatment of a wide variety of NF- $\kappa$ B-linked inflammatory diseases.

### **Acknowledgements**

This study was supported by research Grants from Ministerio de Economía y Competitividad, ISCIII, Eur J Nutr 1 3 FEDER (AGL 2008-02475 and AGL 2011-26949) and Junta de Andalucía (P-10AGR-6609). The authors gratefully acknowledge the assistance of Center for Technology and Innovation Research, University of Seville (CITIUS).

### **5. References**

- [1] Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, von Knethen A, Weigert A. Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal* 2013
- [2] O'Neill LA. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:549-563.
- [3] Sánchez-Miranda E, Lemus-Bautista J, Pérez S, Pérez-Ramos J. Effect of kramecyn on the inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;762020.

- [4] Hernández-Mijares A, Bañuls C, Peris JE, Monzó N, Jover A, Bellod L, Victor VM, Rocha M. A single acute dose of D-Pinitol from a naturally-occurring food ingredient decreases hyperglycaemia and circulating insulin levels in healthy subjects. *Food Chem* 2013;141:1267-1272.
- [5] Kim JC, Shin JY, Shin DH, Kim SH, Park SH, Park RD, Park SC, Kim YB, Shin YC. Synergistic antiinflammatory effects of D-Pinitol and glucosamine in rats. *Phytother Res* 2005;19:1048-1051.
- [6] Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal B.B. D-Pinitol targets nuclear factor-kappaB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1604-1614.
- [7] Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. Anti-inflammatory effect of (+)-D-Pinitol. *Fitoterapia* 2001;72:168-170.
- [8] Sivakumar S, Palsamy P, Subramanian SP. Impact of D-D-Pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2010;188:237-245.
- [9] Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Haribabu L, Nishigaki I, Balasubramanian MP. D-D-Pinitol promotes apoptosis in MCF-7 cells via induction of p53 and Bax and inhibition of Bcl-2 and NF-κB. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:1757-1762.
- [10] Lee JS, Lee CM, Jeong YI, Jung ID, Kim BH, Seong EY, Kim JI, Choi IW, Chung HY, Park YM. D-D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *FEBS Lett* 2007;581:57-64.
- [11] Kim JI, Kim JC, Kang MJ, Lee MS, Kim JJ, Cha IJ. Effects of D-Pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:456-458.
- [12] Lee JS, Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Lee SY, Suh DS, Yoon MS, Lee KS, Choi YH, Chung HY, Park YM. D-D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2007;7:791-804.
- [13] Alleva D. G, Johnson EB, Lio FM, Boehme SA, Conlon PJ, Crowe PD. Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: counter-regulatory activity by IFN-gamma. *J Leukoc Biol* 2002;71:677-685.
- [14] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1107-1112.
- [15] Moorcroft MJ, Davis J, Compton RG. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta* 2001;54:785-803.
- [16] Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1733-1744.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- [18] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18:2195-2224.
- [19] Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol* 2008;29:469-478.

- [20] Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1985;82:7738-7742
- [21] Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:179-189.
- [22] Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer* 2007;121:2357-2363.
- [23] Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. Spinal NF- $\kappa$ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 2004;19:3375-3381.
- [24] Hinz B, Brune K. Specific cyclooxygenase-2 inhibitors. Basis and options of a pharmacotherapeutic concept. *Anaesthesist* 2000;49:964-971.
- [25] Magielse J, Arcoraci T, Breynaert A, van Dooren I, Kanyanga C, Fransen E, Van Hoof V, Vlietinck A, Apers S, Pieters L, Hermans N. Antihepatotoxic activity of a quantified *Desmodium adscendens* decoction and D-D-Pinitol against chemically-induced liver damage in rats. *J Ethnopharmacol* 2013;146:250-256.
- [26] Lee HN, Surh YJ. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1340-1350.
- [27] Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
- [28] Lin TH, Tan TW, Tsai TH, Chen CC, Hsieh TF, Lee SS, Liu HH, Chen WC, Tang CH. D-D-Pinitol Inhibits Prostate Cancer Metastasis through Inhibition of  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin by Modulating FAK, c-Src and NF- $\kappa$ B Pathways. *Int J Mol Sci* 2013;14:9790-9802.
- [29] Rengarajan T, Nandakumar N, Rajendran P, Ganesh MK, Balasubramanian MP, Nishigaki I. D-D-Pinitol mitigates tumor growth by modulating interleukins and hormones and induces apoptosis in rat breast carcinogenesis through inhibition of NF- $\kappa$ B. *J Physiol Biochem* 2015;71:191-204.



## **BLOQUE III: ACTIVIDAD DE RETAMA MONOSPERMA BOISSIER EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

---



**CAPITULO IV. ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF RETAMA  
MONOSPERMA IN ACUTE ULCERATIVE COLITIS IN RATS.**





J Physiol Biochem (2014) 70:163–172  
DOI 10.1007/s13105-013-0290-3

## ORIGINAL PAPER

## Anti-inflammatory effects of *Retama monosperma* in acute ulcerative colitis in rats

Haidee González-Mauraza · Carmen Martín-Cordero ·  
Catalina Alarcón-de-la-Lastra · M Angeles Rosillo ·  
Antonio J. León-González · Marina Sánchez-Hidalgo

Received: 11 June 2013 / Accepted: 9 September 2013 / Published online: 21 September 2013  
© University of Navarra 2013

**Abstract** Inflammatory bowel disease (IBD), which includes ulcerative colitis and Crohn's disease, is a chronic intestinal disorder resultant from a dysfunctional epithelial, innate and adaptive immune response to intestinal microorganisms. Current IBD treatment presents limitations in both efficacy and safety that stimulated for new active drugs. *Retama* spp. have been traditionally used in the Mediterranean region in treatment of pain and inflammation. In this study, the anti-inflammatory and protective properties of a standardised aqueous extract from *Retama monosperma* (RmE) was evaluated in vivo, by intra-colonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats as a Crohn's disease model. The qualitative and quantitative analysis of flavonoids from RmE was performed by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Oral administration of RmE diminished the severity and extension of the intestinal injuries induced by TNBS. In addition, RmE increased mucus production in goblet cells in colon mucosa, decreased neutrophil infiltration and cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) overexpression. Similarly, RmE significantly reduced p38 mitogen-activated protein kinase activation, preventing the inhibitory protein I $\kappa$ B degradation in colonic mucosa. RmE anti-inflammatory effects seem to be related to impairment of neutrophil

function and COX-2 and iNOS down-regulation possibly through p38 MAPK and nuclear transcription factor kappa B signalling pathways. These results suggest that RmE might contribute to the development of new pharmaceutical products for inflammatory bowel disease.

**Keywords** Inflammation · NF- $\kappa$ B · Flavonoids · *Retama monosperma* · TNBS · Ulcerative colitis

### Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes ulcerative colitis and Crohn's disease, is a chronic intestinal disorder resultant from a dysfunctional epithelial, innate and adaptive immune response to intestinal microorganisms [21]. The immune and inflammatory response is predominantly mediated by activated neutrophils, monocytes and macrophages and characterised by an enhanced formation of reactive oxygen and nitrogen species [9].

A complex system of intracellular signalling molecules, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) or the nuclear transcription factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), influences this uncontrolled immune system activation and inflammation by ultimately modulating gene transcription [23]. Likewise, the up-regulation of certain pro-inflammatory proteins such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) has also been involved and considered important determinant of colonic damage [25]. The current status of drug therapy for ulcerative colitis is not very satisfactory; there has

H. González-Mauraza · C. Martín-Cordero ·  
C. Alarcón-de-la-Lastra · M. A. Rosillo ·  
A. J. León-González · M. Sánchez-Hidalgo (✉)  
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy,  
University of Seville, Seville, Spain  
e-mail: hidalgosanz@us.es

been an urgent need for alternative medicine with high efficacy and fewer side effect.

The primary goal of medical therapy for IBD is to suppress inflammation to provide relief of symptoms and achieve mucosal healing. Plants with anti-inflammatory activity represent still a large untapped source new anti-inflammatory drugs for the treatment of IBD. In this sense, *Retama monosperma* L. (Fabaceae), locally named as “retama blanca”, is a legume shrub that establishes mainly on coastal sands and dunes in zones under a Mediterranean climate. *Retama* constitutes a genus comprising four closely related species endemic to the Mediterranean Basin and Canary islands, and decoction of their aerial parts is used as traditional medicine for the treatment of rheumatism [2] and as cicatrizing agent [1]. Some studies have shown anti-ulcerogenic and anti-inflammatory properties on *Retama* extracts [5, 11]. The main constituents of aerial parts of *Retama* spp. are flavonoids, including flavonols, flavons and isoflavons [19], and quinolizidine alkaloids [12]. In fact, different flavonoids have been reported to exert anti-inflammatory activity in preclinical IBD models such as rutin [8], luteolin [16] and genistein [27].

Intra-colonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) is one of the standardised methods to produce an experimental model of IBD, which closely mimic the clinical and morphological features of IBD in particular Crohn's disease [6]. Thus, the aim of this study has been to gain a better understanding of the effects and mechanisms of action of a standardised aqueous extract in flavonoids from *R. monosperma* (RmE) during early colonic inflammation in rats caused by TNBS instillation in rats. Inflammation response was evaluated by histological analysis and determination of mieloperoxidase (MPO) activity, as an index of neutrophil infiltration in the mucosa. In addition, the protein expression of pro-inflammatory enzymes including COX-2 and iNOS, as well as the role of MAPKs and the NF- $\kappa$ B signalling pathways in the anti-inflammatory effect of *R. monosperma* extract on acute colonic inflammation, was evaluated by Western blot.

## Material and methods

### Chemicals

Methanol, acetonitrile and formic acid [high-performance liquid chromatography (HPLC) grade] were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The standards

compounds, i.e. daidzin, rutin, genistin, daidzein, luteolin, apigenin and genistein, were procured from Extrasynthese (Lyon, France). 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) was purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

### Plant material

Aerial parts of *R. monosperma* (L.) Boiss were harvested in the dune area of “El Rompido” spit (Huelva, Spain, 7°10' W, 37°12' N) on September, 2010, and identified by Dr. Juan Gallego-Fernández, Department of Plant Biology and Ecology, University of Seville. A voucher specimen (no. 277799) was deposited on the herbarium of the University of Seville for further reference.

### Preparation of the *Retama monosperma* aqueous extract

Aerial parts were dried at room temperature. Then, 200 g of plant material was powdered and extracted with water (400 mL) at 70 °C, under agitation using magnetic stirrer, during 1 h. The water extract was lyophilised to provide a crude water extract with 14 % yield (28.7 g).

### HPLC/MS/MS conditions

The water extract was dissolved in MeOH to obtain a concentration of 0.5 mg/mL and then filtered. Analysis was performed by HPLC tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) in negative multiple reaction monitoring (MRM) scanning mode, using Perkin Elmer Series 200 HPLC system (Wellesley, USA) equipped with an auto-sampler, binary pump system. Chromatographic separation was achieved by using a Zorbax Eclipse 2.1×150 mm, 3.5- $\mu$ m particle size XDB-C18 column (Agilent). The mobile phase for chromatographic separation was composed of solvent A (0.1 % of formic acid in water) and solvent B (0.1 % of formic acid in acetonitrile) under gradient elution, starting at 10 % B, isocratic for 5 min, then increased linearly to 100 % B over 15 min, held constant for 5 min, then reduced linearly to 10 % B for 5 min and then held constant for an additional 5 min, at a flow rate of 0.2 mL/min. The injection volume was 20  $\mu$ L. A mass spectrometer used for the detection was QTRAP system (Applied Biosystems, Foster City, USA), consisting of



an hybrid triple quadrupole linear ion trap (QqQ<sub>LIT</sub>), equipped with electrospray ionisation interface and the acquisition data processor Analyst® 1.4.2 software.

#### Experimental animals

Male Wistar rats supplied by Animal Services, Faculty of Medicine, University of Seville, Spain, and weighing 180–220 g, were placed in a controlled room (temperature, 24–25 °C; humidity, 70–75%; lighting regimen of 12L/12D) and were fed a normal laboratory diet (Panlab, Barcelona, Spain). Rats were deprived of food for 24 h prior to the induction of colitis, but were allowed free access to tap water throughout. They were randomly assigned to groups of 10–11 animals. Experiments followed a protocol observed by the Animal Ethics Committee of the University of Seville, and all experiments were in accordance with the recommendations of the European Union regarding animal experimentation (Directive of the European Council 86/609/EC).

#### Induction of ulcerative colitis

Colitis was induced as previously reported [25]. Different control groups were created for comparison with TNBS/ethanol instillation: Rats in the sham group received an enema of physiological saline instead of the TNBS solution, and ethanol group received 0.25 mL of 50 % ethanol. Aqueous extract of *R. monosperma* (9–18 mg/kg p.o.) was suspended in 0.9 % saline solution and administered by gavage 48, 24 and 1 h prior to the induction of colitis and 24 h later. Control group received vehicle in a comparable volume (10 mL/kg animal). The rats were checked daily for behaviour, body weight and stool consistency. Finally, animals were killed, using an overdose of chloral hydrate 48 h after induction of colitis.

#### Assessment of colitis

The severity of colitis was evaluated by an independent observer who was blinded to the treatment. For each animal, the distal 10 cm portion of the colon was removed and cut longitudinally, slightly cleaned in physiological saline to remove faecal residues and weighed. Macroscopic inflammation scores were assigned based on clinical features of the colon [26]. The presence of adhesions (score 0–2) and/or stool

consistency (score 0–1) were evaluated according to the criteria of Bobin-Dubigeon et al. [3]. Pieces of inflamed colon were collected and frozen in liquid nitrogen to measure biochemical parameters.

#### Histological studies

The distal colon segments from each animal were fixed in 4 % buffered paraformaldehyde, dehydrated in grade ethanol, embedded in paraffin and cut on a rotary microtome (Leica Ultracut). Sections were then cleared, hydrated, stained and examined according to standard protocols [25].

#### Assessment of leucocyte involvement

MPO activity was assessed as a marker of neutrophil infiltration according to the methods of Grisham et al. [14] with slight modifications [25]. Results were quantified as units of MPO/milligram tissue.

#### Isolation of cytoplasmic proteins and Western blot assay

Cytoplasmic proteins were isolated from frozen colonic tissues as previously described [25]. Protein concentration of the homogenate was determined following Bradford's colorimetric method [4]. Aliquots of supernatant contains equal amount of protein (50 µg) were separated on 10 % acrylamide gel by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Then, proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with specific primary antibodies: rabbit polyclonal anti-COX-2 and anti-iNOS (Cayman Chemical, USA) at dilution of 1:3,000, rabbit polyclonal anti-IκBα (Cell Signalling Technology, USA) at dilution of 1:1,000, mouse polyclonal anti-JNK and anti-pJNK (Santa Cruz Biotechnology, Inc) at dilution of 1:200, and mouse polyclonal anti-p38 and anti-pp38 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) at dilution of 1:100 and 1:1,000 respectively, overnight at 4 °C. After that, each filter was washed three times for 15 min and incubated with a horseradish peroxidase-labelled secondary antibody anti-rabbit (Pierce Biotechnology, IL, USA) or anti-mouse (Dako Cytomation, USA) containing blocking solution for 1–2 h at room temperature. To prove equal loading, the blots were analysed for β-actin expression using an anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich, MO, USA). Immunodetection was performed

using enhanced chemiluminescence light-detecting kit (SuperSignal®, IL, USA). Densitometric data were studied following normalisation to the control (house-keeping gene). The signals were analysed and quantified by a Scientific Imaging Systems (KODAK 1D, Image Analysis Software).

#### Data analysis

All values in the figures and text are expressed as arithmetic means $\pm$ SEM. The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey–Kramer multiple comparisons test as post hoc test.  $P<0.05$  were considered statistically significant.

### Results

#### HPLC/MS/MS analysis of flavonoids from RmE

Seven flavonoids, i.e. the flavonol rutin, the flavones luteolin and apigenin, and the isoflavones daidzin, genistin, daidzein and genistein, were identified and quantified by comparing their retention time and selected MRM transitions with standards (Table 1). The quantitative analysis showed that the major flavonoid of the aqueous extract was the isoflavone genistein ( $57.2\pm0.3$  mg/100 g).

#### Protective effects of RmE in acute TNBS-induced colitis in rats

Induction of colitis with TNBS led to prostration, piloerection and hypo-motility of rats. Macroscopic inspection of the cecum, colon and rectum showed evidence of severe colonic mucosal damage, with oedema, deep ulcerations and haemorrhage. Lesions in the distal colon were quantified using a macroscopic damage score ( $9.33\pm0.35$ ) (Fig. 1). Control animals underwent severe anorexia with a marked body weight loss compared with the sham animals. A significant increase in weight/length of the rat colon, an indicator of inflammation, and presence of adhesions to adjacent organs were frequently observed in TNBS-treated rats (Table 2).

Treatment of TNBS rats with RmE reduced the body weight loss. There was also a significant decrease

in the weight/length in RmE-treated rats colon (Table 2) compared with TNBS-treated rats. In addition, RmE at both doses assayed (9 and 18 mg/kg), significantly attenuated the extent and severity of the colonic injury (Fig. 1).

#### Histological studies of the colon after RmE treatment on acute experimental TNBS model

On histological examination of the colon from sham-treated rats, the histological features of which were typical of a normal structure (Figs. 2a and b and 3a). The histopathological features included transmural necrosis, oedema and diffuse inflammatory cells (polymorphonuclear leucocytes, lymphocytes and eosinophils) infiltration in the mucosa (Fig. 3b). We assessed focal ulceration of the colonic mucosa extending through the *muscularis mucosae* as well as desquamated areas or loss of the epithelium (Figs. 2c and d and 3b). The architecture of the crypts was distorted, and the lamina propria was thickened in peripheral areas of distorted crypts, especially in basal areas (Figs. 2c and 3b). Some areas showed accumulation of mucus and cell remnants; however, alcian blue-positive cells were less numerous. Moreover, the mucin layer of the epithelium had disappeared (Fig. 2d). On the contrary, RmE treatment caused an attenuation of morphological signs of cell damage and inflammatory cells were not found in lamina propria (Fig. 3c and d). In some areas, the epithelium remained intact (Fig. 2e), and the mucin layer was clearly visible with alcian blue-positive cells (Fig. 2f).

#### Effect of RmE on colonic leucocyte involvement in acute TNBS-induced colitis

As shown in Fig. 4, a marked increase in MPO activity, an infiltration indicator of the colon with polymorphonuclear leucocytes also characterised the colitis caused by TNBS. This result was consistent with the histological findings. Treatment of TNBS-treated rats with RmE (9 and 18 mg/kg) significantly ( $p<0.05$ ) reduced the degree of polymorphonuclear neutrophil infiltration.

#### RmE seems to modulate the acute colitis through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signalling pathways

The expression levels of COX-2, iNOS, p38 and JNK MAPKs, and I $\kappa$ B $\alpha$  were measured by western blotting



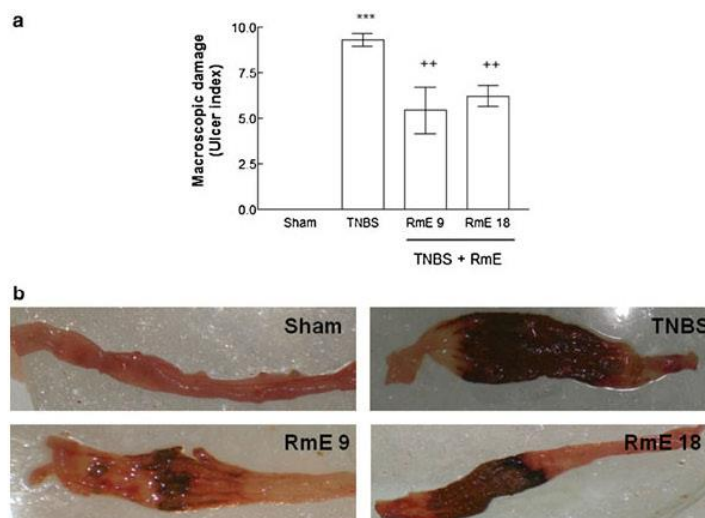
**Table 1** Flavonoid composition of RmE

Flavonoid	Retention time (min)	Precursor ion product transition ( <i>m/z</i> )	Flavonoid concentration (mg/100 g)
Daidzin	8.6	415.1→223.1 415.1→252.1	0.8±0.0
Rutin	8.7	609.2→300.0 609.2→271.1	13.9±0.4
Genistin	10.1	431.2→239.1 431.2→268.0	5.4±0.0
Daidzein	10.2	253.1→133.1 253.1→222.9	4.3±0.2
Luteolin	10.3	285.1→133.0 285.1→151.0	22.2±0.8
Apigenin	10.8	269.1→117.0 269.1→151.0	15.8±0.3
Genistein	10.9	269.1→132.9 269.1→106.9	57.2±0.3

The results are mean values of two replicate measurements ( $n=2$ ), and expressed as milligrams of flavonoids per 100 g of extract  $\pm$ SEM (mg/100 g)

of cytosolic extracts. As regards COX-2 and iNOS expression, exposure of colon to 10 mg/animal of TNBS caused high levels of both pro-inflammatory proteins in comparison with sham animals ( $p<0.001$  and  $p<0.01$ , respectively). Aqueous RmE administration induced a

significant down-regulation of these inflammatory proteins at both concentrations assayed ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.001$  vs. TNBS group) (Fig. 5a, b). In addition, the effect of RmE on the TNBS-induced colitis activations of MAPKs (JNK and p38) was also determined by



**Fig. 1** RmE ameliorates acute TNBS-induced rat colitis. **a** Effects of acute administration of RmE on the colonic damage score. Colonic macroscopic damage resulting from TNBS (10 mg/animal) instilled into rat colon was scored as indicated in “Material and methods”. Scores were quantified in the absence of treatment or in the presence of RmE (9 and 18 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> p.o.). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. **b** Macroscopic

appearance of the colon of rats receiving TNBS only or RmE treatment (9 or 18 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> p.o.) 2 days before TNBS administration (RmE+TNBS). RmE at both doses improved TNBS-induced colitis decreasing the presence of adhesions to adjacent organs and ulcerated surface. \*\*\* $p<0.001$ , significantly different from sham, \*\* $p<0.01$ , significantly different from TNBS

**Table 2** Quantified parameters after administration of RmE (9 and 18 mg/kg p.o.) in rats with acute colitis induced by TNBS intracolonic instillation (10 mg/animal)

Group	n	Body weight changes (g)	Adhesions (score 0–2)	Diarrhoea (score 0–1)	Colon weight/colon length (mg/cm)
Sham	10	26.0±4.83	0	0	0.11±0.04
TNBS	10	10±4.78*	1.4±0.16*	0.81±0.17*	0.26±0.05*
TNBS+RmE 9	10	18.0±8.34 <sup>++</sup>	0.9±0.73	0.2±0.42 <sup>++</sup>	0.18±0.04 <sup>+</sup>
TNBS+RmE18	10	29.5±3.95 <sup>+++</sup>	1.0±0.48	0.4±0.48 <sup>+</sup>	0.19±0.03 <sup>+</sup>

Data are expressed as mean±S.E.M.

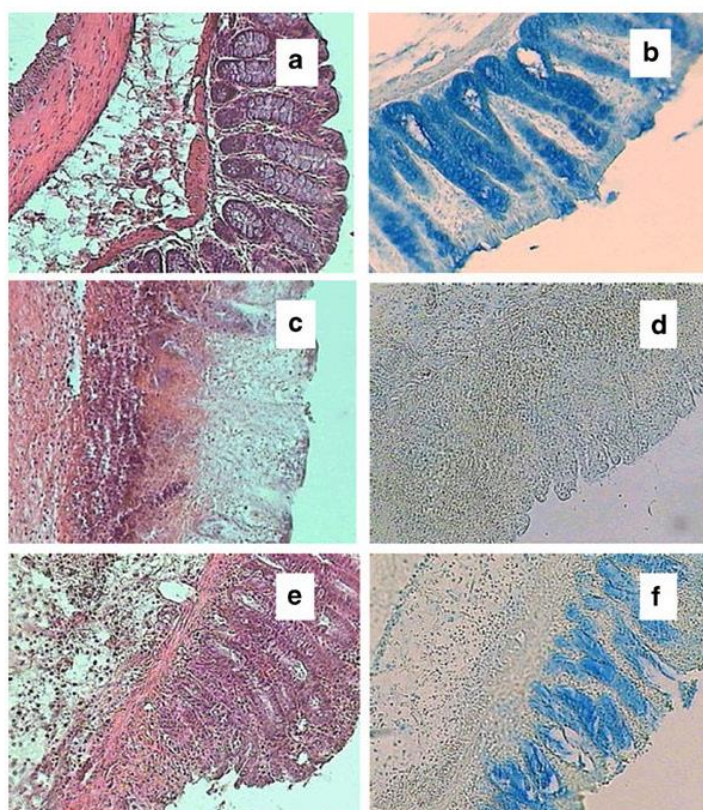
\*  $p<0.01$ , significantly different from sham; <sup>+</sup>  $p<0.05$ , <sup>++</sup>  $p<0.01$  and <sup>+++</sup>  $p<0.001$ , significantly different from TNBS.

Western blot using phosphospecific MAPK antibodies (Fig. 6a, b). To standardise protein loading in each line, blots were stripped and re-probed with the corresponding antibodies against both proteins. A high expression appeared in colon mucosa from control TNBS-treated rats ( $p<0.05$  and  $p<0.01$  vs sham group), indicating that both JNK and p38 protein activation could be induced at the acute stage of colonic lesion caused by TNBS. However, RmE administration prevented potently p38 MAPKs proteins activation at both concentrations

studied. According to JNK MAPK protein, no significant changes were observed after RmE oral administration (Fig. 6a, b).

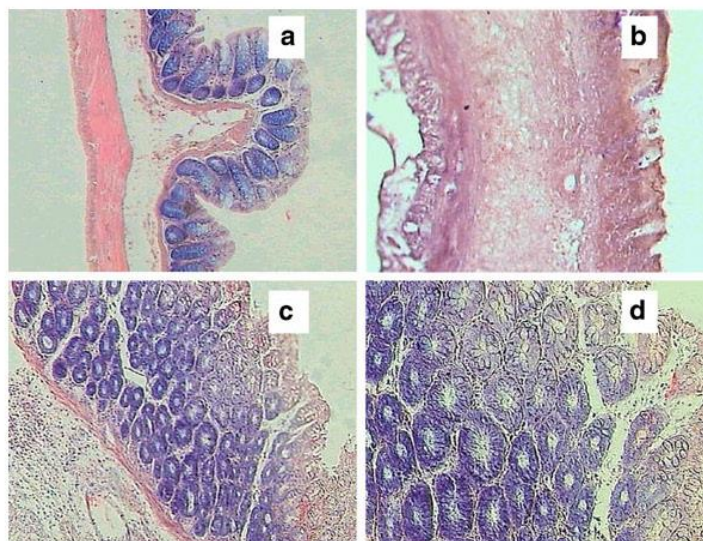
Since NF- $\kappa$ B activity is controlled by the steady state level of I $\kappa$ B $\alpha$ , we further investigated the effect of aqueous RmE on I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in rat's colonic mucosa. As shown in Fig. 7, protein extracts from colon tissues from TNBS-treated rats showed that intestinal inflammation of TNBS group was accompanied with a significant I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. Nevertheless, upon

**Fig. 2** RmE reduces histological damage. Histological appearance of rat colonic mucosa after haematoxylin and eosin stain (H-E), Alcian Blue stain (AB): sham (a, b) and treated with TNBS 10 mg/animal (c, d) and RmE 9 mg/kg p.o. (e, f). a, b No histological modification was present in Sham animals. c, d Mucosal injury was produced after TNBS administration, characterised by necrosis of epithelium, focal ulceration of the mucosa and diffuse infiltration of inflammatory cells in the mucosa and submucosa. e Treatment with RmE 9 mg/kg p.o. reduced the morphological alterations associated with TNBS administration protecting the mucosal architecture. f Some areas showed accumulation of mucus and cell remnants; however, Alcian Blue-positive cells were less numerous and the mucin layer of the epithelium was missing. Original magnification,  $\times 20$





**Fig. 3** RmE reduces colonic infiltration in rat colon segments stained with Giemsa: sham (a) and treated with TNBS 10 mg/animal (b) and RmE 9 mg/kg p.o (c, d). Infiltration of inflammatory cells was highly observed in the colonic mucosa of TNBS-treated animals. RmE prevented development of inflammatory changes. Original magnifications,  $\times 10$  and  $\times 20$



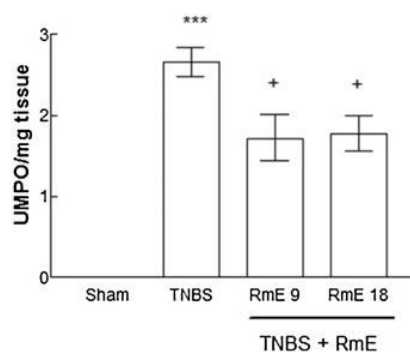
treatment with RmE, the protein expression of I $\kappa$ B $\alpha$  was drastically increased (Fig. 7a, b).

## Discussion

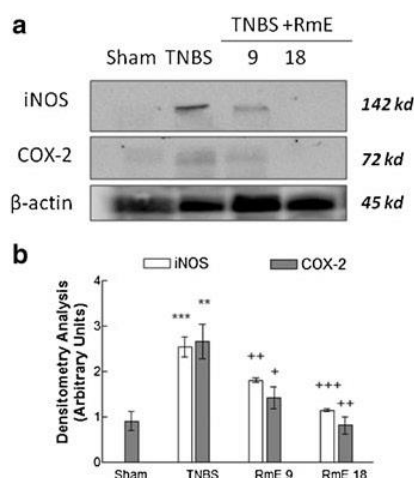
The present study revealed, for the first time, the beneficial anti-inflammatory effect of a standardised aqueous extract from RmE in an experimental murine model of Crohn's disease.

Our findings revealed that RmE administration (9–18 mg/kg) diminished the clinical parameters of damage and inflammation in colonic mucosa induced by TNBS

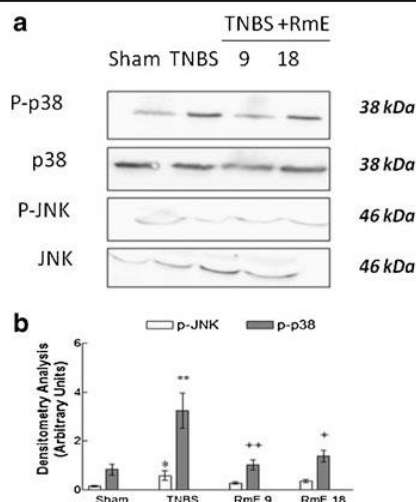
although there was no observed a significant dose response. The reduction in the extension of the colitis accompanied a decrease in the loss of weight, a reduction in the relative weight/length of the colon and a decline of adhesions between the colon and adjacent organs. The presence of adhesions, which results from transmural



**Fig. 4** Inhibitory effect of acute RmE treatment on myeloperoxidase activity (MPO) in TNBS-induced colitis model in rats. MPO activity (U MPO/mg tissue) was increased after TNBS administration when compared with sham group. RmE administration at both doses assayed significantly decreases the MPO activity. \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from sham, \* $p < 0.05$ , significantly different from TNBS

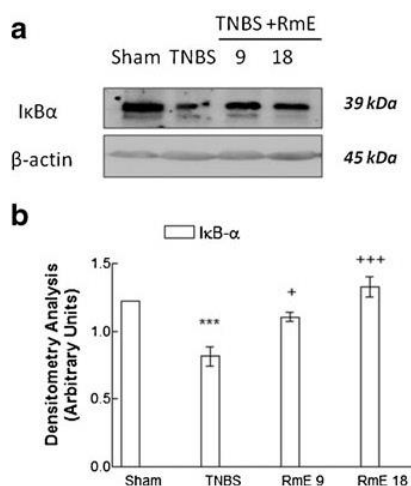


**Fig. 5** COX-2 and iNOS protein expressions are inhibited in colon tissue of TNBS-induced colitis by RmE treatment. COX-2 and iNOS protein expressions were increased in TNBS group when compared with sham control animals. RmE administration treatment diminished the expression of these both pro-inflammatory proteins. Densitometry was performed following normalisation to the control ( $\beta$ -actin house-keeping gene). Data are expressed as the means  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$  significantly different from Sham, + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  and +++ $p < 0.001$ , significantly different from TNBS



**Fig. 6** Effects of RmE on p-JNK and p-p38 MAPKs signalling pathways in colon tissue of TNBS-induced colitis. The results are representative of three experiments performed on different samples. Densitometry was performed following normalisation to the control (JNK and p38 house-keeping genes, respectively). Data are expressed as the means $\pm$ SEM. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 significantly different from sham, + $p$ <0.05 and ++ $p$ <0.01, significantly different from TNBS

inflammation is a common feature of TNBS colitis [26]. The reduction in the incidence of adhesions suggests a



**Fig. 7** Expression of IκBα protein is up-regulated in colonic mucosa of rats with acute TNBS-induced colitis after RmE treatment. The results are representative of three experiments performed on different samples. Densitometry was performed following normalisation to the control (β-actin house-keeping gene). Data are expressed as the means $\pm$ SEM. \*\*\* $p$ <0.001 significantly different from sham, + $p$ <0.05 and +++ $p$ <0.001 significantly different from TNBS

beneficial effect of RmE on the extension of the inflammatory process in this experimental model. Moreover, RmE treatment increased the amount of mucus stained by alcian blue (acid glucoproteins such as sialomucins) in colon mucosa. Alcian Blue-positive cells seem to be associated with regenerative processes of the mucosa, while reduction in the amount stained has been related to decreased resistance of the mucosa and paralleled by alterations in the normal pattern of maturation of the mucin in goblet cells [20].

MPO activity, an indicator for leucocyte infiltration, is another commonly studied and sensitive marker for inflammatory reactions in several tissues [31]. As expected, the injury associated with the instillation of TNBS was related to a significant increase of the activity MPO, whereas this stimulatory effect was completely blocked in those animals that received acute RmE treatment which might contribute, in addition to its antioxidant capacity, to an attenuation in the formation of oxygen and nitrogen free radicals.

On the other hand, COX-2 is an important pro-inflammatory enzyme essential to inflammation, injury repair, and carcinogenesis. COX-2 overexpression lead to the production of ROS and excessive PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>, which are important inflammatory mediators that contribute to the hyperemia, oedema and even dysfunction thereby inducing tissue damage [24]. Similarly, iNOS activation produces an excessive inflammatory response, which may affect to colon mucosa integrity and contributes to the development of intestinal damage [25]. Our results showed that hapten instillation strongly up-regulated COX-2 in colon mucosa; however, RmE treatment especially at the highest concentration, efficiently reduced the overexpression of both COX-2 and iNOS pro-inflammatory enzymes. Thus, a reduction of iNOS and COX-2 expression could play a key role in the anti-inflammatory properties of this extract.

Abnormal signalling pathways play an important role in the inflammatory process and can lead to dysregulation of the inflammatory response being crucial in the pathogenesis of IBD. In this sense, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways play an important role in bowel inflammation and may be responsible for the immunopathogenesis of the overactive immune system for some of these triggers as well [13]. Three major groups of MAPKs have been identified in mammalian cells: the extracellular signal regulated protein kinases (p42/44, also known as ERK), the p38 MAPK and the



JNK. These MAPKs require activation by phosphorylation to perform their intracellular signalling task [10]. In particular, research results have shown that the activity of p38 MAPK increases in patients suffering from IBD [15]. After the activation of p38 MAPK, pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), were raised in both production and secretion. Inversely, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  can activate p38 MAPK as well [18].

One of the well-studied transcription factors downstream of MAPK signalling is the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B pathway is activated in mucosal cells of IBD [28] as well as in experimental colitis models [25]. I $\kappa$ B- $\alpha$  phosphorylation generally leads to the degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  with the concomitant release of NF- $\kappa$ B and its nuclear translocation, which binds to the promoter of many genes essential for inflammation (such as iNOS, COX-2 and TNF- $\alpha$ , among others) regulation of immune system, cell proliferation and survival [7].

In our study, we have demonstrated that the protective effect of RmE on early colonic inflammation involves inhibition of MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathways. Both mechanisms may be functionally interconnected and not act independently. p38 MAPK inhibition has been shown to abolish NF- $\kappa$ B-driven stimulation of gene expression whereas p38 MAPK activation has been suggested to contribute to NF- $\kappa$ B stimulation by modulating the transactivation capacity of the NF- $\kappa$ B p65 subunit [26]. Our results demonstrated that after TNBS induction, p38 MAPK phosphorylation was up-regulated in colon mucosa. On the contrary, p38 MAPK activation was inhibited in RmE-treated rats when compared with TNBS group suggesting an additional pathway by which RmE blocks the acute TNBS-induced inflammation in rats. Moreover, RmE treatment prevented the I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation, which could induce presumably an inhibition of NF- $\kappa$ B activation and the subsequent COX-2 and iNOS proteins expression reduction contributing to a reduction on the development and maintenance of intestinal inflammation.

These beneficial anti-inflammatory effects of RmE might be attributed, at least in part, to its high content of flavonoids, such as genistein, daidzein and their glucosides, rutin, apigenin and luteolin. In fact, some of these flavonoids have been evaluated in preclinical IBD models demonstrating promising results including genistein [27] and rutin [8]. Moreover, luteolin and apigenin have exerted anti-inflammatory activity

mediated through NF- $\kappa$ B nuclear translocation blockage and the subsequent inhibition of production of pro-inflammatory cytokines [29, 30]. Particularly, in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mouse model, luteolin (20 and 50 mg/kg) significantly ameliorated shortening of colon length and histological score as well as inhibited infiltration of macrophages and interferon (IFN)- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells into the colonic mucosa [22]. At the cellular level, a co-culture consisting of intestinal epithelial Caco-2 and macrophage RAW264.7 cells, stimulated with lipopolysaccharide, the addition of luteolin (100  $\mu$ M) suppressed IL-8 messenger RNA (mRNA) expression in Caco-2 cells without epithelial monolayer disruption and pro-inflammatory cytokines mRNA (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) in RAW264.7 cells were also suppressed [22]. Similarly, oral administration of genistein exerted beneficial anti-inflammatory effects in a rodent model of TNBS-induced chronic colitis, reducing the expression of COX-2 mRNA and protein and decreasing the MPO activity [27]. Finally, a diet containing 0.1 % rutin attenuated DSS-induced body weight loss and shortening of the colorectum via inhibition of pro-inflammatory cytokine production [17]. Nevertheless, although flavonoids seem to exert a key role in the anti-inflammatory effect of RmE, other minor bioactive compounds present in the extract or the combination of them might contribute synergically to this beneficial effect.

## Conclusion

In summary, our data confirm the protective effects of RmE standardised in flavonoids in an experimental murine model of Crohn's disease. The anti-inflammatory effects of RmE seem to be related to impairment of neutrophil function and down-regulation of both pro-inflammatory COX-2 and iNOS proteins expression possibly through a p38 MAPK and NF- $\kappa$ B signalling pathway-dependent mechanism. Thus, these results suggest that the anti-inflammatory activity of RmE might contribute to the development of new pharmaceutical products for inflammatory bowel disease treatment.

**Acknowledgements** The research was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (AGL 2011-26949) and Junta de Andalucía (AGR-6609), Spain. The authors gratefully acknowledge the assistance of Center for Technology and Innovation Research, University of Seville (CITIUS).



## References

- Belmokhtar Z, Kaid-Harche M (2012) Evaluation of genetic diversity in three species of *Retama* genus: *R. monosperma* (L.) Boiss, *R. raetam* (Forssk) Webb and *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss. (Fabaceae) based on SDS-PAGE. *Curr Res J Biol Sci* 4:202–205
- Benitez Cruz G (2007) El uso de las plantas a través de la cultura tradicional Lojeña. Fundación Ibn al-Jatib de Estudios de Cooperación. Granada, Cultural
- Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY (2001) Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 9:103–110
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7:248–254
- Bremner P, Rivera D, Calzado MA, Obón C, Inocencio C, Beckwith C, Fiebich BL, Muñoz E, Heinrich M (2009) Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol* 115:295–305
- Brenna O, Furnes MW, Drozdov I, Van Beelen Granlund A, Flatberg A, Sandvik AK, Zwiggelaar RT, Mårvik R, Nordrum IS, Kidd M, Gustafsson BI (2013) Relevance of TNBS-Colitis in rats: a methodological study with endoscopic, historical and transcriptomic characterization and correlation to IBD. *PLoS One* 8:e54543
- Coskun ZK, Kerem M, Gurbuz N, Omeroglu S, Pasaoglu H, Demirtas C, Lortlar N, Salman B, Pasaoglu OT, Turgut HB (2011) The study of biochemical and histopathological effects of spirulina in rats with TNBS-induced colitis. *Bratisl Med J* 112:235–243
- Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A (1998) Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 62:687–695
- Danese S, Fiocchi C (2006) Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 14:4807–4812
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55–72
- El-Toumy SA, Farrag AH, Ellithy MM, Korien KM (2011) Effect of plant derived-phenolic extracts on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *J Pharm Res* 4:189–192
- El-Shazly A, Ateya AM, Witte L, Wink M (1996) Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. *Z. Naturforsch* 51c: 301–308.
- Feng YJ, Li YY (2011) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 12:327–332
- Grisham MB, Benoit JN, Granger DN (1990) Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol* 186:729–742
- Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S (2002) Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 122:7–14
- Karrasch T, Kim JS, Jang BI, Jobin C (2007) The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF- $\kappa$ B<sup>EGFP</sup> transgenic mice through blockade of NF- $\kappa$ B-dependent protective molecules. *PLoS ONE* 2:e596
- Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H (2005) Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 69:395–406
- Li J, Li Z, Mo BQ (2006) Effects of ERK5 MAPK signaling transduction pathway on the inhibition of genistein to breast cancer cells. *J Hyg Res* 35:184–186
- López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Ayuso MJ (1999) Flavonoids of *Retama sphaerocarpa*. *Planta Med* 65:777–778
- Makkink MK, Schwerbrock NM, Mähler M, Boshuizen JA, Renes IB, Cornberg M, Hedrich HJ, Einerhand AW, Büller HA, Wagner S, Enss ML, Dekker J (2002) Fate of goblet cells in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 47:2286–2297
- Neuman MG (2007) Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 149:173–186
- Nishitani Y, Yamamoto K, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M (2013) Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: Role of the aglycone in NF- $\kappa$ B inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors*. doi:10.1002/biof.1091
- O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG (2010) Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 16:1411–1420
- O'Connor WJ, Zenewicz LA, Flavell RA (2010) The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol* 11:471–476
- Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A (2011) Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol* 82:737–745
- Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C (2007) Rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 562:247–258
- Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudénbach-Leschowski U, Diel P (2009) Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr* 48:213–220
- Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M (2011) NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 21:146–158
- Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C (2001) Luteolin inhibits an endotoxin stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 296:181–187
- Xu L, Zhang L, Bertucci AM, Pope RM, Datta SK (2008) Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF-kappaB activation pathway. *Immunol Lett* 121:74–83
- Yamada T, Grisham MB (1991) Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochensh* 69:988–994

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## Resultados y discusión

La EII es una enfermedad de evolución crónica y recidivante en la que se incluyen un conjunto de enfermedades que afecta al tubo digestivo, tales como la CU y la EC. Ambas afectaciones inflamatorias comparten aspectos epidemiológicos y presentan síntomas clínicos, signos radiológicos y hallazgos anatomopatológicos comunes. Si bien, las causas fisiopatológicas de la EII permanecen sin conocerse y, en consecuencia, seguimos sin disponer de un tratamiento curativo, los últimos años han aportado importantes avances en el conocimiento de sus mecanismos patogénicos. En este sentido, se considera que estas enfermedades son la consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos, medioambientales, microbiológicos e inmunes (Neuman y Nanau, 2012).

Los objetivos que se persiguen con el tratamiento en la EII son inducir o mantener la remisión, curar la mucosa, evitar complicaciones, mejorar y mantener la calidad de vida, limitar o eliminar el uso de corticosteroides, evitar la hospitalización y la cirugía, y restaurar y mantener la nutrición.

El tratamiento farmacológico ha ido evolucionando de forma empírica, aunque con una clara dirección sobre el sustrato inflamatorio intestinal. Para ello, se ha ido recurriendo históricamente a los fármacos antiinflamatorios disponibles en cada momento, aprovechando la experiencia clínica de uso. A pesar de los avances terapéuticos enfocados a una terapia antiinflamatoria e inmunomoduladora, no se disponen en la actualidad de fármacos exentos de efectos secundarios y los pacientes se vuelven refractarios.

Las propiedades terapéuticas de muchas terapias complementarias a base de productos naturales, sobretudo las de origen vegetal, ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda y obtención de drogas alternativas que presenten efectos colaterales en menor medida respecto a las convencionales y, de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan sus propias plantas (Langmead y cols., 2002).

Entre la gran variedad de especies vegetales de interés terapéutico, se encuentran las plantas del género *Retama* (Fabaceae), de las que su uso medicinal ha sido respaldado por estudios científicos realizados en varios modelos experimentales, mediante los cuales se han comprobado algunos efectos biológicos y

farmacológicos ya descritos en la literatura. Diferentes estudios han dado a conocer las distintas propiedades que presentan los miembros pertenecientes a este género, como son sus acciones hipoglucemiantes y antimicrobianas, antiulcerosas, antihiperlipidémicas, antioxidantes y antiinflamatorias.

Los principales constituyentes de la parte aérea de *Retama monosperma* son los flavonoides, entre los que se incluyen flavonoles, flavonas e isoflavonas y alcaloides quinolizidínicos. De hecho, varios estudios han demostrado la actividad antiinflamatoria de algunos de sus componentes en modelos preclínicos de EII, tales como rutina, luteolina y genisteína (Lopez-Lazaro y cols., 1999; Cruz y cols., 1998; El-Shazly y cols., 1996; Seibel y cols., 2009; Karrasch y cols., 2007).

Todos estos antecedentes nos condujeron a valorar el potencial antiinflamatorio e inmunomodulador de un extracto acuoso estandarizado de *Retama monosperma* en modelos *in vitro* de células inmunocompetentes murinas y en un modelo animal de inflamación colónica.

Inicialmente, para el estudio fitoquímico de *Retama monosperma* se procedió a la preparación de varios extractos de dicha especie, entre ellos el hexánico y el marco de éste. A continuación, el marco fue sometido nuevamente a una extracción y se obtuvieron los correspondientes extractos de diclorometano, acetato de etilo y butanólico. Concretamente, el extracto butanólico fue estudiado por cromatografía en capa fina (CCF) para la posterior separación de sus componentes por cromatografía sólido-líquido en columna de silicagel. Finalmente, del extracto butanólico se aislaron por técnicas cromatográficas e identificaron por diferentes métodos espectroscópicos un C-heterósido de flavona (apigenina) y por primera vez, un derivado metilado del inositol (pinitol). Asimismo, se determinaron los flavonoides mayoritarios presentes en dicho extracto y estos resultaron ser: flavonoides: rutina; flavonas: luteolina y apigenina; isoflavonoides: daidzina, daizeína, genistina, y genisteína.

La inflamación crónica es el principal factor desencadenante de patologías de gran prevalencia tales como la EII, hipertensión arterial, aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide, cáncer o la enfermedad de Alzheimer, entre otras. Recientes estudios demuestran que el desarrollo y la progresión de las mismas están asociados al aumento en la producción de dichos factores pro-inflamatorios (Sastre y cols., 2006). En lo que respecta a la EII, los macrófagos son efectores de la respuesta innata y están involucrados en el inicio y la regulación de la respuesta adaptativa (Mahida, 2000).

Concretamente, valoramos los efectos del extracto acuoso de *Retama monosperma* y de su componente, D-pinitol, en macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS bacteriano.

Los macrófagos, son células fagocíticas mononucleares del sistema inmunitario involucradas en un gran número de funciones. Son críticas en el mantenimiento de la homeostasis así como en la lucha y establecimiento de defensas contra agentes patógenos (Sozzani y cols., 2002).

La activación de los macrófagos por citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), LPS bacteriano, proteínas de la matriz extracelular, y otros mediadores químicos, perpetúa y amplifica la señal inflamatoria, provocando una rápida liberación de mediadores celulares, entre los cuales se incluyen la histamina, bradicinina, citocinas y quimiocinas, así como una ruptura del balance oxido-reducción intracelular, lo que genera un estado de estrés celular que conlleva a un daño mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno (Li et al., 2012). A su vez, estos mediadores dilatan los vasos sanguíneos locales y aumentan su permeabilidad lo que conduce a la fuga de proteínas plasmáticas en el tejido. También incrementan la sensibilidad al dolor en los tejidos inervados por las terminaciones nerviosas sensoriales, y atraen leucocitos que migran de la sangre al foco inflamatorio.

Es conocido que el LPS provoca la activación de los macrófagos, según la vía clásica, a través de la extraordinaria producción de NO. El NO es una biomolécula multifuncional que interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la EII, aterosclerosis, artritis reumatoide, e incluso, cáncer. En los macrófagos tisulares residentes se producen pequeñas cantidades de NO, el cual actúa como mensajero intracelular, regulando funciones como la inflamación o la eliminación de patógenos; en cambio en los macrófagos activados se produce un exceso de NO debido a unos altos niveles de expresión de iNOS, enzima que convierte L-arginina en NO. El NO al reaccionar con el anión superóxido está implicado en la formación endógena de los peroxinitritos, que resultan ser altamente tóxicos por su capacidad de generar nuevamente grupos hidroxilos (Brown y Borutaite, 2001, Li et al., 2012). La iNOS ejerce funciones críticas en las enfermedades de índole inflamatorio (Cross y Wilson, 2003) y de forma similar, una elevada expresión de la COX-2, enzima pro-inflamatoria que contribuye a la lesión tisular, inducida por endotoxinas bacterianas, citoquinas y factores de crecimiento, está estrechamente relacionada con la patogénesis de la inflamación

(Murakami y cols., 2007), Asimismo, ciertas citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos estimulados por LPS, inducen a su vez una sobreexpresión de COX-2 a través de la vía de señalización celular del NF- $\kappa$ B (Lee y cols., 2004), lo que a su vez conlleva la síntesis de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>, un mediador de la inflamación secundaria que promueve la vasodilatación local y la atracción y activación de los neutrófilos, macrófagos y mastocitos durante la inflamación aguda. Por todo ello, el bloqueo de ambas enzimas proinflamatorias representa importantes herramientas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

En el presente estudio, se observó como la exposición de los macrófagos peritoneales a LPS bacteriano resultó en un aumento significativo de los niveles de nitritos, indicador de la producción de NO, tras 24 h de incubación, así como una sobreexpresión de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS. Por el contrario, los tratamientos con el extracto de *Retama monosperma* y D-pinitol, fueron capaces de inhibir significativamente la producción de nitritos y la sobreexpresión proteica de ambas enzimas proinflamatorias inducida por LPS tras 24 h de incubación, lo que indica un potencial de acción dual sobre estas proteínas y sugiere una reducción de la actividad inflamatoria. Resultados similares han sido descritos para los principales componentes encontrados en la parte aérea de *Retama monosperma*. En este sentido, el tratamiento con daizeína ha demostrado ser capaz de inhibir significativamente la producción de nitritos y la sobreexpresión de iNOS inducida por LPS (Choi y cols., 2012) en la línea celular de macrófagos murina RAW264.7. De forma similar, diversos estudios *in vitro*, han evidenciado una reducción significativa de la respuesta inflamatoria aguda inducida por LPS en macrófagos tratados con los flavonoides: apigenina (Nicholas y cols., 2007; Zhan y cols., 2014), rutina (Guruvayoorappan y Kuttan 2007), luteolina (Chen y cols., 2007) o genisteína (Ji y cols., 2012; Cui y Bilitewski y cols., 2014). Estos resultados también están en concordancia con los resultados derivados de los estudios *in vivo* llevados a cabo por Lee y cols., y Kim y cols., quienes pusieron de manifiesto la actividad anti-inflamatoria de D-Pinitol en un modelo de asma inducida por ovoalbúmina en el que el tratamiento con D-pinitol redujo la inflamación alérgica de las vías respiratorias y la hiperreactividad a través de la supresión de GATA-3 y un aumento de la expresión de T-bet, así como en un modelo murino de inflamación aguda y sub-aguda inducida por carragenina en ratas (Lee y cols., 2007; Kim y cols., 2007).



Entre los mecanismos de señalización celular implicados en esta respuesta inmunoinflamatoria figura la actividad del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B. Estudios previos, han demostrado que el D-Pinitol inhibe la vía de activación del NF- $\kappa$ B, lo que puede explicar su capacidad para suprimir las respuestas celulares inflamatorias (Sethi y cols., 2008). El NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional regulador de la expresión de numerosos genes que codifican moléculas involucradas en el proceso inflamatorio, entre los que podemos incluir COX-2 y ciertas citocinas proinflamatorias. Este factor se encuentra en el citoplasma como un dímero formado por dos subunidades idénticas (homodímero) o diferentes (heterodímeros), siendo el más conocido el complejo p50/p65 y unido a sus inhibidores I $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  y I $\kappa$ B- $\epsilon$ ) que previenen su entrada al núcleo (Whiteside y col., 1997). En el caso de I $\kappa$ B- $\alpha$ , la estimulación de receptores como el receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), receptores TLR o el receptor de linfocito T (TCR) activa al NF- $\kappa$ B a través de la ruta conocida como “canónica”, el cual a través de la activación de IKK fosforila I $\kappa$ B, siendo posteriormente ubiquitinada y degradada por el proteasoma, liberando NF- $\kappa$ B. La degradación de I $\kappa$ B permite por tanto la entrada de la proteína NF- $\kappa$ B al núcleo y su unión a secuencias específicas del ADN, regulando la transcripción de un gran número de genes que codifican citocinas proinflamatorias entre las cuales se incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-23 (Cho y col., 2006).

En nuestro estudio, valoramos los posibles cambios en la activación del NF- $\kappa$ B tras el tratamiento con *Retama monosperma* y D-pinitol a distintas concentraciones ensayadas. La estimulación con LPS indujo la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , permitiendo la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B. Por el contrario, los niveles de expresión de la proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  medidos en la fracción citosólica fueron significativamente superiores en aquellas células tratadas con el extracto acuoso y con D-pinitol, en comparación con el grupo control LPS+DMSO. Como se mencionó anteriormente, esto fue acompañado de una bajada en la expresión proteica de las enzimas COX-2 e iNOS. Estos resultados alcanzados están de acuerdo con un estudio realizado en células dendríticas, donde se demostró la capacidad inhibitoria de 80  $\mu$ M de D-Pinitol sobre la maduración fenotípica y la modulación de la producción de citoquinas Th1 a través del bloqueo de la vía del NF $\kappa$ B (Lee y cols., 2007). Efectos similares han sido recientemente descritos en cáncer de mama y cáncer de próstata, donde el tratamiento D-Pinitol indujo la apoptosis a través de la inhibición de la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B (Rengarajan y cols., 2014; Lin y cols., 2013; Rajendran y cols., 2015).

A continuación, basándonos en los resultados obtenidos procedentes de los ensayos *in vitro*, quisimos indagar en el posible efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Retama monosperma* en un modelo experimental murino de colitis ulcerosa inducida por TNBS.

El TNBS es un compuesto químico que provoca reacciones de hipersensibilidad tardía cuando se aplica a la piel, ya que forma háptenos merced a la presencia de los grupos trinitrofenilo (TNP) convirtiendo las proteínas orgánicas en inmunógenas para su sistema inmune. Cuando se introduce TNBS en el colon de los roedores susceptibles mediante instilación intrarrectal, éste provoca una respuesta inmunitaria mediada por células T en la mucosa del colon, causando una inflamación masiva de la mucosa caracterizada por un infiltrado denso de células T y macrófagos en toda la pared intestinal (Neurath y cols., 1995). Además, se acompaña de una progresiva pérdida de peso, diarrea sanguinolenta, prolapso rectal, engrosamiento de la pared del intestino grueso y lesiones severas en el colon provocando una extensa ulceración (lesión necrótica hemorrágica) e inflamación transmural de los segmentos del colon, observándose una intensa hiperemia y aumento del espesor de la pared intestinal. Asimismo, se producen adherencias del colon a órganos adyacentes (nudos intestinales, estómago, etc.). Todo ello, constituye un patrón no muy distinto del presente en la EC en los humano.

Los resultados obtenidos en los animales tratados con el extracto acuosos de *Retama monosperma*, sugerían, en conjunto, cambios indicativos de cierta mejoría: menor pérdida de peso y menor relación peso/longitud más cercana al grupo de animales sanos que el resto de los grupos tratados. Concretamente, el tratamiento con *Retama monosperma* redujo la pérdida del peso corporal así como la relación peso/longitud del colon, existiendo diferencias estadísticamente significativas tras la administración de ambas dosis ensayadas (9 y 18 mg/kg). No obstante, no se apreciaron cambios significativos en la presencia de adherencias a órganos adyacentes, en aquellas ratas tratadas con el extracto de *Retama monosperma* en comparación con el grupo control TNBS. El tratamiento con *Retama monosperma* a ambas dosis, atenuó significativamente la extensión y severidad del daño colónico. Asimismo, se observó una reducción de las alteraciones morfológicas asociadas a daño celular. En general, se apreció un buen mantenimiento de la arquitectura glandular salvo vacuolización de algunas células mucosas y una disminución notable del infiltrado inflamatorio. Nuestros resultados también reflejan cómo el tratamiento con *Retama monosperma* incrementó la cantidad de células azules (AA) positivas (glucoproteínas ácidas y sialomucina) en mucosa colónica. Con este punto

de partida, nuestra investigación se centró en evaluar los mecanismos de acción implicados en dichos efectos beneficiosos.

Como hemos comentado anteriormente, la COX- 2 es una enzima proinflamatoria que juega un papel relevante en el proceso inflamatorio, la reparación, y en la carcinogénesis. Una sobreexpresión de COX- 2 conlleva a una producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS), prostaglandina (PG)E2 y tromboxano (TXB2), importantes mediadores de la inflamación que contribuyen a la hiperemia, edema e incluso disfunción y daño tisular (*O'Connor y cols., 2010*). De forma similar, la activación de la enzima iNOS, produce una respuesta inflamatoria excesiva que puede afectar a la integridad de la mucosa del colon y contribuye al daño a nivel intestinal. El tratamiento con *Retama monosperma*, redujo significativamente la sobreexpresión de ambas enzimas proinflamatorias. Estos resultados están en concordancia con los previamente obtenidos en los ensayos *in vitro*. Por lo tanto, la reducción de la expresión proteica de las enzimas iNOS y COX- 2 podría desempeñar un papel clave en las propiedades anti-inflamatorias de este extracto. Además, en nuestro estudio, describimos por primera vez, que el efecto protector de este extracto en la inflamación colónica crónica, conlleva una inhibición de las vías de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y del factor de transcripción nuclear NFkB, las cuales parecen estar interconectadas y juegan un papel importante en el control de la inflamación (*Wei y Feng, 2010*).

Las vías de las MAPK representan rutas claves a través de las cuales los estímulos proinflamatorios extracelulares se transmiten en respuestas nucleares. Debido a su implicación en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, la inflamación, y las enfermedades inmunológicas, han emergido recientemente, como dianas celulares en la terapia de estas enfermedades (*Gupta y Nebreda, 2015*). En respuesta a determinados estímulos pueden activarse tres subfamilias de proteínas MAPK: ERK, JNK y p38 MAPK. Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial. Una vez que ha alcanzado el núcleo, las MAPK terminales en estas cascadas fosforilan cierta cantidad de factores de transcripción claves en el proceso inflamatorio, incluyendo AP-1 y NF-κB. Estos últimos promueven a su vez la transcripción de genes responsables de la activación de las células inflamatorias e inmunocompetentes y la expresión de proteínas mediadoras claves con el consiguiente efecto biológico.

Nuestros resultados demostraron un aumento en la fosforilación de p38 MAPK, tras la instilación con TNBS en mucosa de colon. Por el contrario, la activación de p38 MAPK fue inhibida en aquellas ratas tratadas con el extracto, en comparación con el grupo TNBS, lo que sugiere una vía adicional a través de la cual, el extracto de *Retama monosperma* bloquea la inflamación aguda inducida por TNBS en ratas. Por otra parte, el tratamiento con *Retama monosperma* impidió la degradación de la proteína inhibitoria I $\alpha$ B- $\alpha$ , lo que podría inducir presumiblemente una inhibición de la activación del NF-kappa B con una posterior reducción de la expresión de las proteínas COX-2 e iNOS, contribuyendo a una reducción en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación intestinal. De nuevo, estos resultados son paralelos a los obtenidos *in vitro* en células inmunocompetentes. Estos efectos antiinflamatorios beneficiosos del extracto podrían atribuirse, al menos en parte, a su alto contenido de flavonoides, tales como genisteína, daidzeína y sus glucósidos, rutina, apigenina y luteolina. De hecho, algunos de estos flavonoides han sido evaluados en modelos preclínicos de EII que demuestran resultados prometedores incluidos genisteína (Seibel y cols., 2009) y rutina (Cruz y cols., 1998)[8]. Por otra parte, luteolina y apigenina han demostrado poseer actividad antiinflamatoria mediante el bloqueo de la vía del NFkB y la consecuente inhibición de las citocinas proinflamatorias (Nishitani y cols., 2013; Xagorari y cols., 2001; Xu y cols., 2008). No obstante, aunque los flavonoides parecen ejercer un papel clave en el efecto antiinflamatorio de *Retama monosperma* en la respuesta inflamatoria aguda y en la EII, otros compuestos bioactivos presentes en la planta, tales como el pinitol, o en combinación con éstos, podrían contribuir de manera sinérgica a sus efectos antiinflamatorio e inmunomodulador, al compartir, como hemos comprobado en nuestros ensayos *in vitro*, el mismo mecanismo de acción.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el extracto acuoso de *Retama monosperma*, ejerce un papel preventivo en el desarrollo de la EII, resultando ser una alternativa terapéutica natural prometedora, carente de los efectos indeseables que acompañan a la farmacología clásica y contribuyendo así, a la prevención de patologías crónicas con una alta prevalencia en la población actual.



## **CONCLUSIONES**

---



Los resultados de la presente Tesis Doctoral nos permiten concluir:

1. El extracto butanólico obtenido de la sumidad fructificada de *Retama monosperma* destaca por su riqueza en flavonoides y en polialcoholes cíclicos.
2. Han sido aislados por técnicas cromatográficas e identificados por diferentes métodos espectroscópicos un C-heterósido de flavona (apigenina) y un derivado metilado del inositol (pinitol).
3. El tratamiento con *Retama monosperma* y su derivado metilado, pinitol, a las concentraciones ensayadas, no afectó a la viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón.
4. *Retama monosperma* y pinitol, presentaron una marcada actividad anti-inflamatoria al reducir la producción de nitritos y la sobreexpresión de las enzimas pro-inflamatorias COX-2 e iNOS a través de la inactivación de la vía de señalización del NFκB en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS.
5. La administración oral del extracto acuoso de *Retama monosperma* disminuyó la extensión y severidad del daño colónico en un modelo agudo de colitis ulcerosa experimental.
6. El efecto protector del extracto acuoso de *Retama monosperma* en la colitis aguda inducida por TNBS implicó una reducción de la sobreexpresión de COX-2 e iNOS a través de una inhibición de la activación del factor nuclear NF-κB y de la vía de las MAP cinasas.
7. El extracto acuoso de *Retama monosperma* podría ser considerado una terapia alternativa a la terapéutica actual en el manejo de los pacientes de EII, al ejercer efectos beneficiosos sin los efectos indeseables que acompañan a la farmacología clásica, promoviendo una mejora de la salud pública con respecto a la prevención de patologías crónicas con alta prevalencia en la población.







## **BIBLIOGRAFIA**

---



**Bibliografía**

Abraham C, Cho JH . Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. .Inflamm Bowel Dis. 2006 Jul;12(7):641-50.

Abraham, C. and J. Cho. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2009; **15**(7): 1090-1100.

Abraham, C. and J. H. Cho. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. Inflamm Bowel Dis. 2006;**12**(7): 641-650.

Abraham C, Cho JH . Inflammatory bowel disease.N Engl J Med. 2009 Nov 19;361(21):2066-78. doi: 10.1056/NEJMra0804647.

Akobeng AK, Zachos M. Tumor necrosis factor-alpha antibody for induction of remission in Crohn's disease. Cochrane Database of Systematic Reviews 2003, Issue 4. Art. No.: CD003574. DOI: 10.1002/14651858.CD003574.pub2.

Alarcon de la Lastra C, Barranco, M.D, Motilva, V, Herrerias, JM. Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil.Curr Pharm Des, 2001; 7(10): 933-50.

Alarcon de la Lastra, C, Martin MJ, Herrerías J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin induced gastric oxidative damage in rats.Dig Dis Sci, 2002; 47(12): 2783-90.

Algandaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA, Hajar. Epub 2010 Jun 9. Mechanisms of the antihyperglycemic activity of Retama raetam in streptozotocin-induced diabetic rats. AS Food Chem Toxicol. 2010 Aug-Sep;48(8-9):2448-53. doi: 10.1016/j.fct.2010.06.010

Angós Musgo R. Terapéutica de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: Terapéutica farmacológica de los trastornos del aparato digestivo, metabolismo y sistema endocrino. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2013. p. 227-248

Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 2008 Feb 13;56(3):1148-57. doi: 10.1021/jf071811q. Epub 2008 Jan 4.

Belmokhtar Z, Harche MK. In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss.. *Nat Prod Res.* 2014;28(24):2324-9. doi: 10.1080/14786419.2014.934237. Epub 2014 Jul 17.

Belmokhtar Z, Harche MK . In vitro antioxidant activity of *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Nat Prod Res.* 2014;28(24):2324-9. doi: 10.1080/14786419.2014.934237.

Belayachi L, Aceves-Luquero C, Merghoub N, Bakri Y, Fernández de Mattos S, Amzazi S, Villalonga P. *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Jan 24;14:38. doi: 10.1186/1472-6882-14-38.

Bremner P, Rivera D, Calzado MA, Obón C, Inocencio C, Beckwith C, Fiebich BL, Muñoz E, Heinrich M. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol.* 2009 Jul 15;124(2):295-305. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.035. Epub 2009 May 3.

Braam, B., M. Langelaar-Makkinje, A. Verkleij, H. Bluysen, T. Verrips, H. A. Koomans, J. A. Joles and J. A. Post. Anti-oxidant sensitivity of donor age-related gene expression in cultured fibroblasts. *Eur J Pharmacol*; 2006. 542(1-3): 154-161.

Bremer PJ, Monk I, Osborne CM. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *J Food Prot.* 2001 Sep;64(9):1369-76

Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5814-22.

Burakoff R. Indeterminate colitis: clinical spectrum of disease. *J Clin Gastroenterol*. 2004 May-Jun;38(5 Suppl 1):S41-3

Burisch J1, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013 Jul;29(4):357-62. doi: 10.1097/MOG.0b013e32836229fb.

Butterworth AD, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Jul 16;(3):CD006634. doi: 0.1002/14651858.CD006634.pub2.

Cárdeno A, Magnusson MK, Strid H, Alarcón de La Lastra C, Sánchez-Hidalgo M, Ohman L. The unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil promotes apoptosis and attenuates activation and homing properties of T cells from patients with inflammatory bowel disease. *L.Food Chem*. 2014 Oct 15;161:353-60.

Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Cortes-Delgado A, Alarcón de la Lastra C. Mechanisms involved in the antiproliferative and proapoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells. *Nutr Cancer*. 2013a;65(6):908-18.

Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcón de la Lastra C. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Nutr Cancer*. 2013b;65(1):147-56.

Cario E1, Jung S, Harder D'Heureuse J, Schulte C, Sturm A, Wiedenmann B, Goebell H, Dignass AU. Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *Eur J Clin Invest*. 2000 May;30(5):419-28.

Catana R, Barboiu M, Moleavin I, Clima L, Rotaru A, Ursu EL, Pinteala M. Dynamic constitutional frameworks for DNA biomimetic recognition. *Chem Commun (Camb)*. 2015 Feb 7;51(11):2021-4. doi: 10.1039/c4cc07525k

Chatu S, Subramanian V, Saxena S, Pollok RC. The role of thiopurines in reducing the need for surgical resection in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014; 109: 23-34; quiz 35. doi: 10.1038/ajg.2013.402

Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013, Issue 4. Art. No.: CD000545. DOI: 10.1002/14651858.CD000545.pub4.

Chang KH, Burke JP, Coffey JC. Infliximab versus cyclosporine as rescue therapy in acute severe steroid-refractory ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2013; 28: 287-93. doi: 10.1007/s00384-012-1602-8.

Chen CY1, Peng WH, Tsai KD, Hsu SL. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kappaB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sci*. 2007 Nov 30;81(23-24):1602-14. Epub 2007 Oct 5.

Choi EY1, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ. Anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of daidzein in murine macrophages stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Periodontol Res*. 2012 Apr;47(2):204-11. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01422.x. Epub 2011 Oct 5

Cobrin GM, Abreu MT . Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:277-95.

Cooke, J., H. Zhang, L. Greger, A. L. Silva, D. Massey, C. Dawson, A. Metz, A. Ibrahim and M. Parkes . Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Di*. 2012; 18(11): 2128-2137.

Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:179-189.



Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci.*1998. 62:687–695

Cui S, Bilitewski U. Effect of genistein on the TLR and MAPK transduction cascades in lipopolysaccharide -stimulated macrophages. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2014 Mar;30(3):233-6.

Da W, Zhu J, Wang L, Lu Y. Efficacy and safety of certolizumab pegol for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Adv Ther.* 2013; 30: 541-53. doi: 10.1007/s12325-013-0026-3.

Edziri H1, Mastouri M, Mahjoub MA, Mighri Z, Mahjoub A, Verschaeve L. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers. *Molecules.* 2012 Jun 13;17(6):7284-93. doi: 10.3390/molecules17067284.

Eddouks M1, Maghrani M, Louedec L, Haloui M, Michel JB. Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *J Herb Pharmacother.* 2007;7(2):65-77.

El-Matary W, Vandermeer B, Griffiths AM. Methotrexate for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, Issue 3. Art. No.: CD007560. DOI: 10.1002/14651858.CD007560.pub2

El-Shazly A, Ateya, AM, Witte L, Wink M. Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. *Z. Naturforsch.*1996. 51c: 301–308

Elson CO1, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:260-76.

Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2012, Issue 10. Art. No.: CD000544. DOI: 10.1002/14651858.CD000544.pub3.

Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Gillies R, Hopkins M, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332(5):292-7.

Fidder HH, Singendonk MM, van der Have M, Oldenburg B, van Oijen MG. Low rates of adherence for tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors in Crohn's disease and rheumatoid arthritis: results of a systematic review. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(27): 4344-50. doi: 10.3748/wjg.v19.i27.4344.

Ford AC, Peyrin-Biroulet L. Opportunistic infections with anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy in inflammatory bowel disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108(8) :1268-76. doi: 10.1038/ajg.2013.138.

Franke, A., T. Balschun, T. H. Karlsen, J. Sventoraityte, S. Nikolaus, G. Mayr, F. S. Domingues, M. Albrecht, M. Nothnagel, D. Ellinghaus, C. Sina, C. M. Onnie, R. K. Weersma, P. C. Stokkers, C. Wijmenga, M. Gazouli, D. Strachan, W. L. McArdle, S. Vermeire, P. Rutgeerts, P. Rosenstiel, M. Krawczak, M. H. Vatn, I. s. group, C. G. Mathew and S. Schreiber. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* ; 2008. 40(11): 1319-1323

Ghouri YA, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPont AW. Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014 Dec 9;7:473-87. doi: 10.2147/CEG.S27530. eCollection 2014.

Glocker, E. O., D. Kotlarz, K. Boztug, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*; 2009. 361(21): 2033-2045.

Gupta J1, Nebreda AR, Roles of p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J.* 2015 May;282(10):1841-57. doi: 10.1111/febs.13250. Epub 2015 Mar 16.

Guruvayoorappan C, Kuttan G. Rutin inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in lipopolysaccharide and concanavalin-a stimulated macrophages. *Drug Metabol Drug Interact.* 2007;22(4):263-78.

Hale LP, Greer PK, Trinh CT, Gottfried MR. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. *Clin Immunol.* 2005 Aug;116(2):135-42.

Hampe, J., A. Franke, P. Rosenstiel, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*; 2007. 39(2): 207-211.

Hanai H, Sugimoto K . Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(18):2087-94.

Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med.* 1997 Dec;130(6):576-84.

Hsu, W. H., B. H. Lee, T. H. Liao, Y. W. Hsu and T. M. Pan . Monascus-fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- $\gamma$  regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem Toxicol*; 2012. 50(5): 1178-1186.

Huibregtse IL, van Lent AU, van Deventer SJ . Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut. *Gut.* 2007 Apr;56(4):584-92. Epub 2006 Oct 17.

Harborne J.B.. Chemosystematics of the leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe genisteae. *Phytochemistry*. 8.1969; 1449-1456.

Ji G, Zhang Y, Yang Q, Cheng S, Hao J, Zhao X, Jiang Z Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF- $\kappa$ B following AMP kinase activation in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One*. 2012;7(12):e53101.

Kampkötter A, Nkwonkam CG, Zurawski RF, Timpel C, Chovolou Y, Wätjen W, Kahl R. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. 2007 May 5;234(1-2):113-23. Epub 2007 Feb 21.

Karrasch T, Kim JS, Jang BI, Jobin C. The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF- $\kappa$ BEGFP transgenic mice through blockade of NF- $\kappa$ B-dependent protective molecules. *PLoS ONE*. 2007. 2:e596

Keighley MR1, Stockbrugger RW. Inflammatory bowel disease .*Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Nov;18 Suppl 3:66-70.

Khor B, Gardet A, Xavier RJ . Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):307-17. doi: 10.1038/nature10209.

Khor, C, Hibberd ML. Revealing the molecular signatures of host-pathogen interactions. *Genome Biol* . 2011; **12**(10): 229.

Kim H, Kong H, Choi B, Yang Y, Kim Y, Lim MJ, Neckers L, Jung Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res*. 2005 Sep;22(9):1499-509. Epub 2005 Aug 24.

Kim JI, Kim JC, Kang MJ, Lee MS, Kim JJ, Cha IJ. Effects of D-Pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:456-458

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice:

attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol.* 2005 Feb 1;69(3):395-406. Epub 2004 Dec 15.

Langmead L, Chitnis M, Rampton DS. Use of complementary therapies by patients with IBD may indicate psychosocial distress. *Inflamm Bowel Dis.* 2002 May;8(3):174-9.

Larrosa M, González-Sarriás A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuño M, Toti S, Tomás-Barberán F, Dolara P, Espín JC. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem.* 2010 Aug;21(8):717-25. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.04.012. Epub 2009 Jul 18.

Lashner BA, Kirsner JB. The epidemiology of inflammatory bowel disease: are we learning anything new? *Gastroenterology.* 1992 Aug;103(2):696-8.

Lawson MM, Thomas AG, Akobeng AK. Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. Art. No.: CD005112. DOI: 10.1002/14651858.CD005112.pub2

Lee JS, Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Lee SY, Suh DS, Yoon MS, Lee KS, Choi YH, Chung HY, Park YM. D-D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2007;7:791-804.

Lee JS, Lee CM, Jeong YI, Jung ID, Kim BH, Seong EY, Kim JI, Choi IW, Chung HY, Park YM. D-D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. *FEBS Lett* 2007;581:57-64.

Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. Spinal NF- $\kappa$ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 2004;19:3375-3381.

Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2002 Nov 4;196(9):1175-88.

Levine, B. and V. Deretic (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.*2007 ;(10): 767-777.

Lim WC, Hanauer S. Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 12. Art. No.: CD008870. DOI: 10.1002/14651858.CD008870.

Lin, Z., J. P. Hegarty, G. John, A. Berg, Z. Wang, R. Sehgal, D. M. Pastor, Y. Wang, L. R. Harris, 3rd, L. S.Poritz, S. Schreiber and W. A. Koltun. NOD2 Mutations Affect Muramyl Dipeptide Stimulation of Human B Lymphocytes and Interact with Other IBD-Associated Genes. *Dig Dis Sci.*2013

Liu, J. Z., J. R. Hov, T. Folseraas et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet*; 2013. 45(6): 670-675.

Lesage, S., H. Zouali, J. P. Cezard et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotypephenotypiccorrelation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4): 845-857.

López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Ayuso MJ. Flavonoids of *Retama sphaerocarpa*. *Planta Med.*1999.65:777–778.

Louis, E., C. Libioulle, C. Reenaers, J. Belaiche and M. Georges. Genetics of ulcerative colitis: thecome-back of interleukin 10. *Gut*; 2009. 58(9): 1173-1176.

MacDonald JK, McDonald JWD. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. *CochraneDatabase of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD006097. DOI: 10.1002/14651858.CD006097.pub2.

Martín-Cordero C, Lopez-Lazaro M, Espartero JL, Ayuso MJ. Retamatrioside, a New Flavonol Triglycoside from *Retama sphaerocarpa* J. *Nat. Prod.* 2000, 63, 248-250.

Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, de la Lastra CA . The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model.Br J Pharmacol. 2006 Apr;147(8):873-85.

Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. Biochem Pharmacol. 2004 Apr 1;67(7):1399-410.

Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, Jeppsson B. The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. Gastroenterology. 1996 Aug;111(2):334-44

McDonald JWD, Feagan BG, Jewell DP, Brynskov J, Stange EF, MacDonald JK. Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease. Cochrane Database of Systematic Reviews 2005, Issue 2. Art. No.: CD000297. DOI: 10.1002/14651858.CD000297.pub2.

McGrath J,McDonald JWD,MacDonald JK. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2004, Issue 4. Art. No.: CD004722. DOI: 10.1002/14651858.CD004722.pub2

Marshall JK, Thabane M, Steinhart AH, Newman JR, Anand A, Irvine EJ. Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010, Issue 1. Art. No.: CD004115. DOI: 10.1002/14651858.CD004115.pub2

Marshall JK, Thabane M, Steinhart AH, Newman JR, Anand A, Irvine EJ. Rectal 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Nov 14; 11:CD004118. doi: 10.1002/14651858.CD004118.pub2.

Merghoub N, Benbacer L, El Btaouri H, Ait Benhassou H, Terryn C, Attaleb M, Madoulet C, Benjouad A, El Mzibri M, Morjani H, Amzazi S..In vitro antiproliferative effect and induction of apoptosis by Retama monosperma L. extract in human cervical cancer cells. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2011 Oct 15;57 Suppl:OL1581-91

Montenegro L, Piscitelli D, Giorgio F1, Covelli C, Fiore MG, Losurdo G, Iannone A, Ierardi E, Di Leo A, Principi M. Reversal of IgM deficiency following a gluten-free diet in seronegative celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 14;20(46):17686-9. doi: 10.3748/wjg.v20.i46.17686

Motilva, V., E. Talero, J. R. Calvo, I. Villegas, C. Alarcón de la Lastra and S. Sánchez-Fidalgo. Intestinal immunomodulation. Role of regulative peptides and promising pharmacological activities. *Curr Pharm Des*.2008; 14(1): 71-95.

Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer* 2007;121:2357-2363.

Naidoo K, Gordon M, Fagbemi AO, Thomas AG, Akobeng AK . Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Dec 7;(12):CD007443. doi: 10.1002/14651858.CD007443.pub2.

Narula N, Charleton D, Marshall JK. Meta-analysis: peri-operative anti-TNF $\alpha$  treatment and post-operative complications in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013; 37(11): 1057-64. doi: 10.1111/apt.12313

Neuman MG1, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res*. 2012 Jul;160(1):29-44. doi: 10.1016/j.trsl.2011.09.001. Epub 2011 Sep 24.

Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):7121-7.

Nishitani Y, Yamamoto K, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M. Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: Role of the aglycone in NF- $\kappa$ B inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors* 2013. doi:10.1002/biof.1091



O'Connor WJ, Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. 2010. *Nat Immunol* 11:471–476

Pajares JM, Gisbert JP . Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig.* 2001 Jan;93(1):9-20.

Parkes, M., J. C. Barrett, N. J. Prescott et al. Sequence variants in the autophagy gene IRG1 and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*; 2007. 39(7): 830-832.

Patel SV, Patel SV, Ramagopalan SV, Ott MC. Laparoscopic surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of perioperative complications and long term outcomes compared with open surgery. *BMC Surg.* 2013; 13: 14. doi: 10.1186/1471-2482-13-14.

Perez-Jimenez F1, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Perucho M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F, International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest*, 2005; 35(7): 421-4.

Rioux, J. D., R. J. Xavier, K. D. Taylor et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*; 2007. 39(5): 596-604.

Rosillo MA, Sánchez-Hidalgo M, Cárdeno A, Aparicio-Soto M, Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, de la Lastra CA . Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol Res.* 2012 Sep;66(3):235-42. doi: 10.1016/j.phrs.2012.05.006. Epub 2012 Jun 4.

Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A, de la Lastra CA. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. *Biochem Pharmacol*. 2011 Oct 1;82(7):737-45. doi: 10.1016/j.bcp.2011.06.043. Epub 2011 Jul 7.

Samsami-Kor M1, Daryani NE2, Asl PR3, Hekmatdoost A4. . Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. *Arch Med Res*. 2015 May;46(4):280-5. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.005.

Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA .Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice.. *J Nutr Biochem*. 2013a Jul;24(7):1401-13.

Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, Villegas I, Rosillo MA, de la Lastra CA Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice. *Eur J Pharm Sci*. 2013b

Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Cárdeno A, Talero E, Sánchez-Hidalgo M, Motilva V, Alarcón de la Lastra C . Extra-virgin olive oil-enriched diet modulates DSS-colitis-associated colon carcinogenesis in mice..*Clin Nutr*. 2010 Oct;29(5):663-73.

Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibargüen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C . Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model..*Eur J Nutr*. 2012 Jun;51(4):497-506.

Schultz M . Low literacy skills needn't hinder care. *RN*. 2002 Apr;65(4):45-8

Segal D, MacDonald JK, Chande N. Low dose naltrexone for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 2. Art. No.: CD010410. DOI: 10.1002/14651858.CD010410.pub2

Seibel J, Molzberger AF, Hertrampf T, Laudénbach- Leschowski U, Diel P. Oral treatment with genistein reduces the expression of molecular and biochemical markers of

inflammation in a rat model of chronic TNBS-induced colitis. *Eur J Nutr.* 2009. 48:213–220

Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal B.B. D-Pinitol targets nuclear factor-kappaB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1604-1614.

Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale?. *Inflamm Bowel Dis.* 2000 May;6(2):107-15

Sherlock ME, Seow CH, Steinhart AH, Griffiths AM. Oral budesonide for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 10. Art. No.: CD007698. DOI: 10.1002/14651858.CD007698.pub2.

Shibolet O, Regushevskaya E, Brezis M, Soares-Weiser K. Cyclosporine A for induction of remission in severe ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005, Issue 1. Art. No.: CD004277. DOI: 10.1002/14651858.CD004277.pub2

Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM. Modulation of transcription factors by curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:127-4

Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition.* 2008; 24:733–743.

Sicilia B, Vicente R, Gomollón F. Epidemiology of inflammatory bowel disease: controversies in classical epidemiology. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2009 Jun;39(2):135-45.

Silverberg, M. S., L. Mirea, S. B. Bull, J. E. Murphy, A. H. Steinhart, G. R. Greenberg, R. S. McLeod, Z. Cohen, J. A. Wade and K. A. Siminovitch. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1\*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; 2003. 9(1): 1-9

Singh K, Jaggi AS, Singh N. Exploring the ameliorative potential of Punica granatum in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytother Res*. 2009 Nov;23(11):1565-74. doi: 10.1002/ptr.2822.

Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):829-39. doi: 10.1124/jpet.109.160838. Epub 2009 Nov 25.

Smits LP1, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology*. 2013 Nov;145(5):946-53. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.058. Epub 2013 Sep 7.

Surh YJ . Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol*. 2002 Aug;40(8):1091-7

Swan K, Allen PJ. Omega-3 fatty acid for the treatment and remission of Crohn's disease. *J Complement Integr Med*. 2013 May 7; 10. pii:/j/cim.2013.10.issue-1/jcim-2012-0010/jcim-2012-0010.xml. doi: 10.1515/jcim-2012-0010.

Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E, Arató A. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease .*Clin Exp Immunol*. 2008 Jan;151(1):34-41. Epub 2007 Nov 7.

Szigethy E, McLafferty L, Goyal A. Inflammatory bowel disease .*Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2010 Apr;19(2):301-18, ix. doi: 10.1016/j.chc.2010.01.007.

Targan SR, Karp LC . Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:296-305.

Taylor RA1, Leonard MC. Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies. *Altern Med Rev*. 2011 Jun;16(2):152-6.

Timmer A, McDonald JWD, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 9. Art. No.: CD000478. DOI: 10.1002/14651858.CD000478.pub3.

Thompson, A. I. and C. W. Lees. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* ; 2011.17(3): 831-848.

Touati D, Atta-ur-Rahman, Ulubelen A. Alkaloids from *Ruta montana*. *Phytochemistry*. 2000 Jan;53(2):277-9. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jan 24;14:38. doi: 10.1186/1472-6882-14-38.

Van der Heide F, Dijkstra G, Porte RJ, Kleibeuker JH, Haagsma EB . Smoking behavior in liver transplant recipients .*Liver Transpl*. 2009 Jun;15(6):648-55. doi: 10.1002/lt.21722..

Van Limbergen, J., R. K. Russell, E. R. Nimmo, B. Kabakchiev, H. E. Drummond, J. Satsangi and D. C. Wilson. Haplotype-Tagging Analysis of Common Variants of the IL23R Gene Demonstrates Gene-wide Extent of Association with IBD. *Inflamm Bowel Dis* ; 2013.19(6): E79-E80

Wehkamp J1, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL . . Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18129-34. Epub 2005 Dec 5

Wheeler DS1, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR . Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells.*J Nutr*. 2004 May;134(5):1039-44.

Xagorari A, Papapetropoulos A, Mauromatis A, Economou M, Fotsis T, Roussos C. Luteolin inhibits an endotoxin stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.*2001.296:181–187

Xu L, Zhang L, Bertucci AM, Pope RM, Datta SK. Apigenin, a dietary flavonoid, sensitizes human T cells for activation-induced cell death by inhibiting PKB/Akt and NF-kappaB activation pathway. *Immunol Lett.*2008. 121:74–83

Yang CS, Lambert JD, Hou Z, Ju J, Lu G, Hao X . .Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol Carcinog.* 2006 Jun;45(6):431-5

Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42:25–54.

Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 1. Art. No.: CD000542. DOI: 10.1002/14651858.CD000542.pub2

Zhang D, Xiong B, Li X, Xu T, Yu M. Meta-analysis: serious adverse events in Crohn's disease patients treated with TNF-alpha inhibitors. *Hepatogastroenterology.* 2013; 60(126): 1333-42.

Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H4Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One.* 2014 Sep 5;9(9):e107072. doi: 10.1371/journal.pone.0107072. eCollection 2014.

Zhang Z, Hinrichs DJ, Lu H, Chen H, Zhong W, Kolls JK . After interleukin-12p40, are interleukin-23 and interleukin-17 the next therapeutic targets for inflammatory bowel disease?. *Int Immunopharmacol.*2007 Apr;7(4):409-16. Epub 2006 Nov 13.